SCHAUM'S ouTlines

全美经典学习指导系列

生物化学

（第二版）

〔澳〕P. W. 库彻 G. B. 罗尔斯顿 等 著

姜招峰 等 译

- 830个详细疑难解答
- 几百个练习题
- 涵盖所有要点，可辅助任何一本教科书
- 有效提高学习成绩
- 易于自学

科学出版社

麦格劳-希尔教育出版集团

(O-1094.0107)
责任编辑：谢灵玲

SCHAUM'S outlines

全球销量超越3000万的

“全美经典学习指导系列”是您的最佳学习伴侣！

40年来最畅销的教辅系列
全美著名高校资深教授倾力之作
国内重点高校任课教师全力推荐并担当翻译
省时高效的学习辅导，全面详细的习题解答
迄今为止国内最全面的教辅系列
覆盖大学理工科专业

全美经典学习指导系列

概率和统计
统计学
离散数学
Mathematica使用指南
数理金融引论
机械振动
微分方程
统计学原理（上）
统计学原理（下）
微积分
静力学与材料力学
有限元分析
传热学
近代物理学
2000工程力学习题精解
工程力学
3000物理习题精解
流体动力学
物理学基础
材料力学
2000离散数学习题精解
工程热力学
数值分析
量子力学
有机化学习题精解
3000化学习题精解
大学化学习题精解
电路
电气工程基础
工程电磁场基础
数字信号处理
数字系统导论
数字原理
电机与机电学
基本电路分析
信号与系统
微生物学
生物化学
生物学
分子和细胞生物学
人体解剖与生理学

http://www.scienceep.com http://www.mheducation.com

ISBN 7-03-009719-X
9 787030 097194 >
ISBN 7-03-009719-X/Q · 1094
定 价：40.00 元

696

全美经典学习指导系列

生 物 化 学

（第二版）

〔澳〕P.W.库彻 G.B.罗尔斯顿 等 著

姜招峰 等 译

A0960443

科 学 出 版 社

麦格劳-希尔教育出版集团

2002

内 容 简 介

本书共分 17 章，通过问题解答和实例分析对生物化学的基本内容及新的进展进行了简明扼要的介绍。本书表述风格独特，基本内容以客观描述为主，选择性内容通过实例分析进行探讨。它以简明而有趣的问题和丰富的背景知识来反映概念的发展与演化，由此促进并引导读者对疑难问题的思考，激发研究探索的欲望。

本书由澳大利亚著名大学生物化学系中众多具丰富教学经验的教师撰写而成，在第一版基础上经过内容的调整和平衡，保证所有章节在深度上更适合读者。由北京联合大学教授姜招峰博士主持翻译，译文较好地保持了原书风格，力求叙述规范贴切、语言自然流畅。

本书可供生命科学专业的本科师生或自学者参考。

Philip W. Kuchel, Gregory B. Ralston et al. Shaum's Outlines of Theory and Problems of Biochemistry, Second Edition

ISBN:0-07-0361495

Copyright © 1997 by the McGraw-Hill Companies, Inc.

Authorized translation from the English language edtion published by McGraw-Hill Companies, Inc.

All rights reserved.

本书封面贴有 McGraw-Hill 公司防伪标签，无标签者不得销售。

图字:0-2001-1768

图书在版编目（CIP）数据

生物化学/〔澳〕库彻（Kuchel, P. W.）等著；姜招峰等译. -2 版. -北京：科学出版社，2002.2

（全美经典学习指导系列）

ISBN 7-03-009719-X

Ⅰ.生… Ⅱ.①库… ②姜… Ⅲ.生物化学 Ⅳ.Q5

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2001）第 064949 号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

http://www.sciencep.com

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2002 年 2 月第 一 版 开本:A4（890×1240）

2002 年 2 月第一次印刷 印张:28 3/4

印数:1—5 000 字数:940 000

定价：40.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉）

译者名单

姜招峰　陈　文

魏　涛　阎　雁

张　蕾　王卫平

译 者 序

作为生命科学核心基础的生物化学学科进展极为迅速，与其他学科相互渗透的程度亦愈加深入；而作为向初学者传授生物化学知识的教材和生物化学课程的特点是：内容较为抽象，信息量较大且更新速度较快。这给学习者、讲授者和编写者都带来了一定的困难。

各式各样的生物化学教材及参考书在容量、范围、深度、叙述方式和角度等方面均做了大量的探索和有益的实践，其中不乏佼佼之著。

科学出版社引进的全美经典学习指南系列《生物化学》分册（原书名为 *Schaum's Outlines of Theory and Problems of Biochemistry*）是由澳大利亚著名大学具有丰富生物化学教学经验的教师所编写。本书对生物化学的基本内容及新的进展进行了简明扼要的介绍。

本书的表述风格独特。它通过提出“有趣的问题”来引出新的主题，其解答并不完全依赖于前述的课文内容，对一个问题的解答常会导致另一个问题的出现，这易于引导读者对疑难问题的思考，并激发研究探索的欲望。基本内容以客观描述事实为主，选择性的内容是通过实例分析来探讨的。读者可利用本书中介绍的内容，至少在一个合理的深度上理解和分析这些问题。本书主要是为学习生命科学及其相关专业的大学生而编写的，对初学生物化学的学生和高年级学生都是有益的。对于讲授生物化学课程的教师而言，本书亦具有实际的参考价值。

在翻译的过程中，本人由衷地折服于作者们把深奥复杂的问题叙述得如此简单准确的能力和直面疑难问题的坦诚和科学态度，并力求在译文中保持原著中“准确而朴实”的语言风格。对译文中的不妥之处，敬请读者指教（本人的 E-Mail：Zfjiang@163bj．com）。

姜招峰

2001 年 11 月 25 日

第二版前言

自从本书第一版问世以来，生物化学的某些领域已有了很大的发展，特别是分子生物学、信号转导和蛋白质结构等领域。这些领域的发展使其他领域（特别是传统的生物化学领域，如：酶动力学）黯然失色。第二版包容了这些快速发展的领域及其新的进展。第二版也给了我们一个机会来调整和平衡本书的内容，以保证所有章节在深度的选择上更能适应我们的读者。

近 10 年来，生物化学的主要发展是在分子生物学领域，第二版反映了这些领域的巨大变化。我们非常感谢 Emma Whitelaw 博士在第 17 章的修订过程中做出的真诚努力。此外，感谢 Anthony 博士和 Dong Chappell 博士在 DNA 动力学的易于理解方面，以及将 DNA 重组技术的发展和聚合酶链反应融入这个新版本中所付出的劳动；感谢 Glenn King 博士，Mitchell Guss 博士和 Michael Morris 博士对本书第二版蛋白质部分的重要修订，使其反映了这个领域的基本发展状况（特别是在蛋白质折叠方面）。本书重新绘制了大量的图以反映我们新的理解，由此，我们感谢 Mark Smith 先生，Eve Szabados 博士和 Michael Morris 博士在绘图方面所做出的努力。

扩充和加强了脂膜，膜功能和信号转导等部分的内容，以反映这些领域的现代进展，这是 Samir Samman 博士和 Arthur Conigrave 博士做出的努力。氮代谢这一章及核苷酸中部分内容也已扩充，而关于特殊氨基酸代谢的内容被相应地减少；这得益于 Richard Christopherson 博士的努力，谨此致谢。

为了避免课程内容过分的膨胀而且还能反映出许多学院在酶学和酶动力学内容的教学上所进行的改进和完善，本书对这些内容进行了调整；感谢 Ivan Darvey 博士对这部分内容所提出的批评和建设性的意见。

在本版中保持了第一版的叙述风格，以简明而有趣的问题来反映这个领域中概念的发展和演化，并由此来促进对这个领域中一些疑难问题的思考和探索。

因此，本书是由许多在各自领域做出过贡献的合作者（其参与的部分如上所述）与我们共同努力完成的。

W. 库彻

B. 罗尔斯顿

第一版前言

本书是澳大利亚最大的大学生物化学系中近半数的教师合作撰写而完成的。我们在医学、牙科学、药学、兽医学和工程学等院系给 1000 多名学生讲授生物化学。那么，本书是为谁而编？其目的又是什么呢？

正如书名（*Schaum's Outlines of Theory and Problems of Biochemistry*）所称，本书是一本生物化学“纲要”（主要是哺乳动物生物化学），而不是该学科的全面详尽的著作。换句话说，它不是一本百科全书，对于攻读理学学士学位（或相应的学位）的大学生而言，我们希望它只是一个理解生物化学的向导。

生物化学已成为生物学和医学许多领域的基本语言；其基本规律和实验方法是所有基础生物学及其分支学科（如上所列）的基本内容。实际上，医学与生物化学之间的界线已变得越来越模糊了。因此，在本书中，我们力图通过问题的解答和列举实例对生物化学的基本规律进行了解释。在某种意义上来讲，我们把这本书定义在生物化学领域；简言之，我们认为它是使用化学概念来描述发生在生命有机体中的基本过程以及通过生命有机体作用而发生的基本过程。

当然，细胞中的化学过程不只是发生在单一的溶液中，而且也与大分子的结构密切相关。因此，生物化学就不可避免地涉及到：组织结构、细胞结构、细胞器结构及其单个分子本身的结构。由于这个缘故，本书是以对下列研究内容的概要介绍作为开始的：细胞及其细胞器成分，它们是如何组成的，以及（用基本术语来讲）它们有什么生物学功能等。其后的六章主要是从化学的角度分门别类地介绍了生物化学化合物。然后是三章关于酶学和代谢调控基本规律的内容；紧随其后的是生物化学真正的核心内容：代谢途径。

对本书中内容表述的风格稍加评价是值得的。首先，我们所谓的“有趣的问题”是在书中以单词“问题”来表示的；它引出一个新的主题，其答案对于前面的课文内容可能不一定适合。我们认为这能更密切地体现和强调各类研究工作中的问题探索，包括生物化学：对一个问题的解答常会很快地导致另一个问题的出现。其次，与本系列其他分册类似，重点强调的是以一般事实形式提供的基本材料；而选择性的材料是以示例的形式体现的。这些例子中，某些是以问题的方式出现的，另一些在于特定领域中表明基本观点的特殊例子只做了简单的说明。第三点，带有答案的问题依其题号与课文中相应的部分相关。实际上，在所有的情况中学生应能够利用本纲要中的材料，至少在一个合理的深度上解答这些问题。最后一点，补充问题通常是与前述的三种形式的内容有些关系；这些问题的答案列于书后。

本书是教师们撰写的，然而，它的完成也依赖于其他人的许多努力，我们感谢他们。在打字和文字处理方面，我们感谢 Anna Dracopoulos、Bev Longghurst-Brown、Debbie Manning、Hilary McDermott、Elisabeth Sutherland、Gail Turner、Mary Walsh 以及编辑助理 Merilyn Kuchel。在书稿内容的分析评价方面，我们感谢 Ivan Darvey 博士和许多学生，而特别要感谢的是 Tiina Iisma、Glenn King、Kiaran Kirk、Michael Morris、Julia Raftos 和 David Thorburn。Arnold Hunt 博士在筹备本书的早期阶段给予了帮助。我们对在这个计划实施的初期逝世的 Reg O'Brien 博士表示沉痛的悼念。他对本书的撰写的内容和用词有很高的要求，我们希望他对本书最终的构成形式示以赞同。最后我们感谢 McGraw-Hill 出版公司的 Elizabeth Zayatz 和 Marthe Grice，Elizabeth 对本书的构思给予了高度重视，并且他们二人付出了巨大的努力使本书得以出版。

W. 库彻

B. 罗尔斯顿

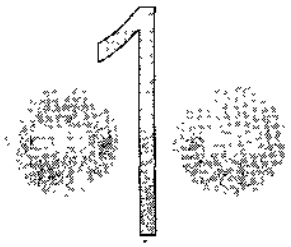
目　录

译者序
第二版前言
第一版前言
第 1 章　细胞超微结构 …… (1)
1.1　导言 …… (1)
1.2　研究细胞结构与功能的方法 …… (1)
1.3　亚细胞器 …… (6)
1.4　细胞类型 …… (12)
1.5　细胞结构层次 …… (14)
第 2 章　碳水化合物 …… (20)
2.1　导言和定义 …… (20)
2.2　甘油醛 …… (21)
2.3　简单醛糖 …… (22)
2.4　简单酮糖 …… (24)
2.5　D-葡萄糖的结构 …… (26)
2.6　葡萄糖的构像 …… (29)
2.7　葡萄糖以外的单糖 …… (31)
2.8　糖苷键 …… (35)
2.9　多糖 …… (38)
第 3 章　氨基酸和肽 …… (44)
3.1　氨基酸 …… (44)
3.2　氨基酸的酸碱性质 …… (47)
3.3　氨基酸分析 …… (54)
3.4　肽键 …… (55)
3.5　半胱氨酸反应 …… (56)
第 4 章　蛋白质 …… (63)
4.1　导言 …… (63)
4.2　蛋白质的纯化与鉴定 …… (63)
4.3　蛋白质折叠 …… (70)
4.4　蛋白质结构 …… (73)
4.5　序列同源性与蛋白质进化 …… (82)
4.6　蛋白质构象的测定方法 …… (83)
第 5 章　蛋白质：超分子结构 …… (91)
5.1　导言 …… (91)
5.2　超分子结构的装配 …… (91)
5.3　蛋白质的自我聚合 …… (94)
5.4　血红蛋白 …… (98)
5.5　细胞外基质 …… (101)
5.6　细胞骨架 …… (109)
第 6 章　脂、膜、运输和信号 …… (128)

6.1 导言……（128）
6.2 脂的分类……（129）
6.3 脂肪酸……（130）
6.4 甘油脂……（131）
6.5 鞘脂……（134）
6.6 源自异戊二烯（萜）的脂类……（136）
6.7 脂在水中的性质……（138）
6.8 胆汁酸和胆盐……（140）
6.9 血浆脂蛋白……（141）
6.10 小泡 ……（142）
6.11 膜 ……（143）
6.12 运输 ……（147）
6.13 跨膜转运的分子机制 ……（151）
6.14 信号 ……（153）
第 7 章 核酸 ……（164）
7.1 导言……（164）
7.2 核酸及其化学组成……（164）
7.3 核苷……（166）
7.4 核苷酸……（167）
7.5 多聚核苷酸……（169）
7.6 DNA 的结构 ……（170）
7.7 DNA 的变性 ……（175）
7.8 DNA 的大小、组构和拓扑学 ……（178）
7.9 RNA 的结构和类型 ……（179）
7.10 核酸酶 ……（180）
第 8 章 酶的催化作用 ……（188）
8.1 基本概念……（188）
8.2 酶的分类……（189）
8.3 提高键断裂速率的方式……（191）
8.4 速率提高和活化能……（196）
8.5 定点诱变……（196）
第 9 章 酶动力学 ……（207）
9.1 导言和定义……（207）
9.2 依赖于底物浓度的酶反应速率……（208）
9.3 K_m 和 V_{max}的图解求值……（209）
9.4 酶抑制的定义……（209）
9.5 酶抑制方程……（210）
9.6 米氏方程的基本机制……（210）
9.7 复杂的稳态方程式的推导……（211）
9.8 多反应物酶……（213）
9.9 pH 对酶反应速率的影响 ……（215）
9.10 酶抑制的机制 ……（216）
9.11 调节酶 ……（218）
第 10 章 代谢：基本原理……（240）
10.1 导言 ……（240）

10.2　热力学 ……（240）
10.3　氧化还原反应 ……（244）
10.4　ATP 及其在生物能学方面的作用 ……（246）
10.5　代谢途径的控制步骤 ……（247）
10.6　调控信号的放大 ……（248）
10.7　细胞内的区室与代谢 ……（250）
第 11 章　糖代谢 ……（257）
11.1　糖酵解 ……（257）
11.2　丙酮酸的去向 ……（264）
11.3　糖异生 ……（267）
11.4　Cori 循环 ……（269）
11.5　糖原代谢 ……（270）
11.6　进入糖酵解途径的其他碳水化合物 ……（272）
11.7　细胞液中 NAD^+ 的再生成 ……（274）
11.8　糖酵解作用的调控 ……（276）
11.9　糖酵解过程中激素的作用 ……（277）
11.10　磷酸戊糖途径 ……（280）
第 12 章　柠檬酸循环 ……（285）
12.1　导言 ……（285）
12.2　柠檬酸循环反应 ……（286）
12.3　柠檬酸循环的能量学 ……（289）
12.4　柠檬酸循环的调节 ……（289）
12.5　丙酮酸脱氢酶复合体 ……（291）
12.6　丙酮酸羧化酶 ……（292）
12.7　柠檬酸循环的两性特点 ……（293）
12.8　乙醛酸循环 ……（293）
第 13 章　脂类代谢 ……（299）
13.1　导言 ……（299）
13.2　脂类的消化 ……（299）
13.3　脂蛋白代谢 ……（301）
13.4　贮存脂类的动员 ……（305）
13.5　脂肪酸的氧化 ……（305）
13.6　由脂肪酸产生的乙酰－CoA 的去路：生酮作用 ……（308）
13.7　脂肪的生成 ……（310）
13.8　磷脂与鞘脂类的合成 ……（314）
13.9　前列腺素 ……（318）
13.10　胆固醇的代谢 ……（321）
13.11　脂类代谢的调控 ……（325）
第 14 章　氧化磷酸化作用 ……（332）
14.1　导言 ……（332）
14.2　电子传递链的成分 ……（332）
14.3　电子传递链的构成 ……（334）
14.4　电子传递与 ATP 合成的偶联 ……（336）
14.5　线粒体产生的质子数与传递给氧的电子数的比率 ……（337）
14.6　质子传递机制的模型 ……（338）

14.7 ATP 合酶 …… (340)
14.8 ATP 合成的机制 …… (341)
14.9 腺嘌呤核苷酸转入与转出线粒体 …… (342)
第 15 章 氮代谢 …… (346)
15.1 氨基酸的合成及食物来源 …… (346)
15.2 蛋白质的消化 …… (351)
15.3 氨基酸代谢动力学 …… (355)
15.4 氨基酸的分解代谢 …… (356)
15.5 多余氮的处理 …… (358)
15.6 嘧啶与嘌呤代谢 …… (361)
15.7 一碳化合物的代谢 …… (369)
15.8 卟啉代谢 …… (372)
第 16 章 遗传物质的保持和复制 …… (378)
16.1 导言 …… (378)
16.2 DNA 的半保留复制 …… (378)
16.3 DNA 复制的拓扑学 …… (379)
16.4 DNA 复制的调控 …… (382)
16.5 细菌 DNA 复制的酶学 …… (384)
16.6 细菌中复制起始的分子事件 …… (388)
16.7 细菌染色体复制的终止 …… (389)
16.8 真核生物 DNA 复制的起始、延伸和终止 …… (390)
16.9 DNA 复制的抑制剂 …… (391)
16.10 DNA 损伤的修复 …… (393)
16.11 DNA 重组和基因分离 …… (394)
16.12 聚合酶链反应 …… (396)
第 17 章 基因表达和蛋白质合成 …… (405)
17.1 导言 …… (405)
17.2 遗传密码 …… (405)
17.3 细菌中的 DNA 转录 …… (407)
17.4 真核生物中的 DNA 转录 …… (409)
17.5 转录因子 …… (409)
17.6 RNA 转录物的加工 …… (411)
17.7 基因组的组构 …… (413)
17.8 转录的抑制剂 …… (413)
17.9 mRNA 翻译的装置 …… (414)
17.10 细菌中的 RNA 翻译 …… (416)
17.11 真核生物中 RNA 的翻译 …… (418)
17.12 蛋白质的翻译后修饰 …… (418)
17.13 翻译的抑制剂 …… (419)
17.14 基因表达的调控 …… (421)
补充问题答案 …… (429)



细胞超微结构

1.1 导言

问题：什么是生命的基本单位？

一切动、植物及微生物都是由细胞组成的。在细菌中，细胞的容量只有 10^{-18}L，而在乌贼的大神经细胞中，细胞的容量可以达到毫升级。典型的哺乳动物细胞直径为 10～100μm，比最小的可见微粒还要小。它们通常具有易弯曲的结构，其起划界作用的膜处于动态的波动状态。不同的动、植物组织具有不同类型的细胞，其不同不仅在于它们结构不同，也在于具有不同的代谢活动。

例 1.1

荷兰 Delft 布商列文虎克（1632～1723 年）自己磨制了透镜，并制造了可以放大 200 倍的简单显微镜。1676 年 10 月 9 日，他寄了一封长达 17 页半的信给伦敦皇家协会。在信中，他描述了不同水样中的微生物。这些小的有机物包括我们现在所知道的原生动物和细菌。因此，列文虎克被认为是第一个发现细菌的人。他后来的功绩还包括精子及许多生物种类红细胞的识别。

干细胞发育成具有特殊功能细胞的过程称为分化。这在胚胎中发生的最为活跃，可以从一个由精子与卵子融合而成的细胞分化为大量不同的组织。

细胞可以识别与其类似的细胞，进而结合成一致的器官，这主要依赖于细胞膜上特定的糖蛋白（见第 2 章）。

1.2 研究细胞结构与功能的方法

光学显微镜

许多细胞及其细胞器可与染料发生强烈的反应。因此，将组织切片后，它们可以很容易地通过光学显微镜区分开。有成百上千的对组织成分具有不同选择性的染料被用于这项工作，它们构成了组织学的基础。

例 1.2

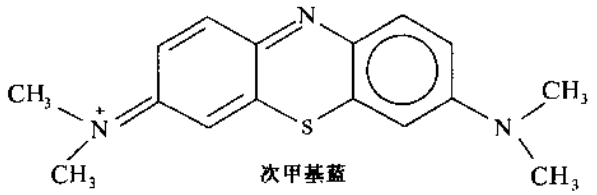
在对患者的医疗生化评价中，一项常用的评价是在显微镜下观察血样，以判定炎性白细胞的数量和类型。将薄薄的一层血涂抹在玻璃片上，并将其置于甲醇中以固定细胞，这个过程使细胞固定并保持其原有形状。细胞通常由几滴两种染液的混合物染色。最常用的是 Romanowsky 染液，这是以 19 世纪它们发明者的名字命名的。常用的血液染色过程是由 J. W. Field 发明的：先用苯胺蓝 I 和次甲基蓝对细胞染色，接着用曙红染色。各种染料都溶解于一个简单的磷酸盐缓冲液中。这种方法可以将细胞核染为蓝色，细胞质染为粉色，部分亚细胞器既可以是粉色也可以是蓝色。以不同的染色方式为基础，至少有五种不同的白细胞可以被识别。而且，胞内有机物，如疟疾的寄生疟原虫被染为蓝色。

我们对组织的不同染色的确切化学机制了解得还很少。因此，组织学在这方面仍然只能凭经验。然而，染料化学结构的某些特点可以对它们的选择性作出一些解释。它们一般是多

环、杂环的芳香化合物，丰富的键合作用使其具有鲜艳的色彩。在许多情况下，它们最初是从植物中分离出来的，带有净正或负电荷。

例 1.3

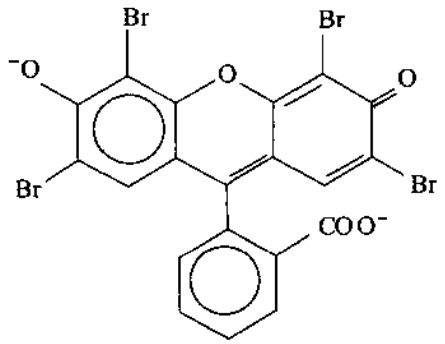
次甲基蓝将细胞核染为蓝色，



次甲基蓝

染色机制：次甲基蓝上带正电荷的氮原子与 DNA 和 RNA 磷酸酯中的氧阴离子发生相互作用（见第 7 章）。

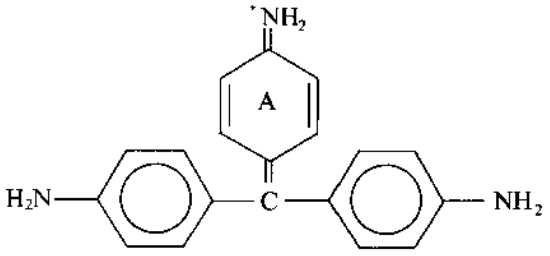
曙红将细胞中富含蛋白质的区域染为红色，



曙红

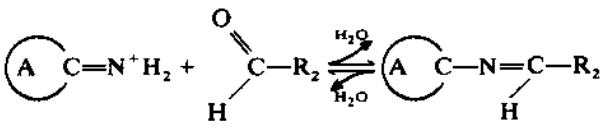
染色机制：曙红在 pH7 时为二价阴离子，与在此 pH 值带正电的精氨酰、组氨酰、赖氨酰等蛋白质基团静电相连。因此，这种染料可以显现细胞中蛋白质丰富的区域。

PAS（高碘酸希夫）染料用于碳水化合物的组织染色，它也同样应用于电泳凝胶（见第 4 章）中糖蛋白（含有碳水化合物的蛋白质；见第 2 章）的染色。该混合染料包含强氧化物高碘酸（HIO_4）和碱性品红：



碱性品红

染色机制：高碘酸在顺-二醇键（即葡萄糖 C2、C3 间的键）打开了糖环，形成了两个醛基和碘氧基（IO_3—）。于是，染料的 $=^{+}NH_2$ 基团与醛基形成了所谓的希夫碱键，将染料与碳水化合物相连。其本反应是：



碱性品红的环 A 转变为芳香环，其中心碳原子为正碳离子（带正电的碳原子），使得复合物

呈粉色。

电子显微镜

通过电子显微镜，可以得到放大200 000倍的组织切片。将样品放在高真空、电子束照射的环境下，电子被样品的不同部分散射。这样，在样品染色时，不同的电子密度代替了光学显微镜使用的有色染料。常用的染料是四氧化锇，它与蛋白质的氨基酸相连，使得电子密集区域呈黑色。

例1.4

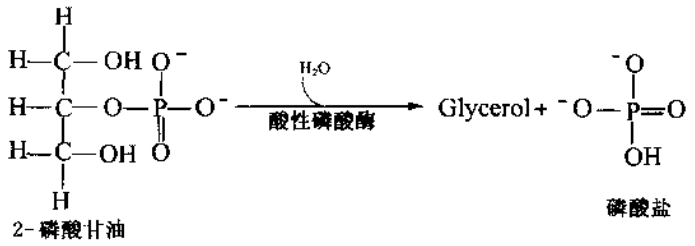
电磁辐射光的波长限制了显微镜的分辨率。设备的分辨率是指通过该设备观察时，可以分辨的两物体间的最小间距，大约是所用电磁波长的一半。被约100 000V电力加速的高速电子也具有电磁波的特性，波长为0.004nm。所以，理论上电镜可达到的分辨率为0.002nm。因为许多球蛋白，如血红球蛋白的直径大于3nm，这使得至少在理论上，甚至蛋白质分子的某些特点也是可区分的。但是实际上，这种分辨率一般是达不到的。

组织化学和细胞化学

组织化学研究整个组织，而细胞化学是研究单个细胞。这些学科的技术为在细胞和组织中定位特定的化合物和酶提供了方法。组织切片与目标酶的底物一起孵育，这一反应的产物与存在于孵育混合物中的色素发生反应。如果样品在孵育前固定得很好，并且固定过程没有对酶造成损伤，那么，这个过程将会使组织薄片中含酶的细胞在显微镜下显现。若具有更高的分辨率，还可以使含有该酶的亚细胞器显现。

例1.5

酸性磷酸酶存在于许多细胞的溶酶体中（见1.3），其中包括肝细胞。它催化从不同磷酸酯上水解下磷酸基团，如下式：



2-磷酸甘油　　磷酸盐

在Gomori过程中，样品在含有2-磷酸甘油的缓冲液中于37℃孵育30min。接着，将样品上的磷酸酯洗脱，并将其放在另一含有硝酸铅的缓冲液中。2-磷酸甘油可自由地穿过溶酶体膜，而带有更多电量的磷酸盐却不行。所以，所有由磷酸酶水解下的磷酸盐都被留在了溶酶体内。由于Pb^{2+}可以渗入溶酶体，它们会以磷酸铅的形式沉淀。这些沉淀的部位在电子及光学显微图上都显现为深色斑点。

放射自显影

放射自显影是对细胞内具有放射活性的化合物进行定位的一项技术，它可以在光学或电子显微镜下进行。活细胞首先暴露于胞内组分的放射活性前体。被标记的前体是有一个或多个氢原子（^1H）被放射性氚（^3H）所代替的化合物。如，[^3H]胸腺嘧啶脱氧核苷是DNA的标记前体，而[^3H]尿嘧啶核苷是RNA的标记前体（见第7章）。不同含氚的氨基酸也适用。被标记的前体进入细胞并与适当的大分子结合。接下来，这些细胞被固定，样品被嵌于树脂或石蜡中，进而被切成薄片。

放射活性是通过在暗室中用照相的卤化银感光剂涂在切片表面上测定的。等感光剂晾干后，将其放置在一个不透光的盒子内，放射性衰变使表面的感光剂曝光。曝光的时间依赖于样品的放射性大小，一般情况下，光镜需要几天至几周，而电镜需要几个月。电镜需要长的

暴光时间是由于切片很薄（<1μm），其放射性很少。将制备物通过常规摄影技术显影并固定。这样，细胞内含有放射性分子的区域表面就覆盖了银颗粒。在光镜下，银颗粒为小黑点；在电镜下，为缠绕的黑线。值得注意的是，整个过程只有在前体分子可以穿过细胞膜，且细胞处于将化合物组合成大分子的生命阶段时才有效。

例 1.6

分泌蛋白的合成及从腺体的运输过程可以通过自显影技术示踪。例如，将注射了 [^{3}H] 亮氨酸的大鼠以不同的时间间隔处死，对其前列腺进行放射自显影。在电镜下，注射 4min 后的样品细胞粗面内质网（RER）上出现了银颗粒，表明 [^{3}H] 亮氨酸已经通过附着在 RER 上的核糖体从血液整合入蛋白。30min 后，高尔基体及分泌空泡上也出现了颗粒，反映了标记分泌蛋白从 RER 到这些细胞器的胞内运输。在注射后，放射性蛋白从这些细胞中释放出来，这一点被腺体腔上的银颗粒所证实。

超离心

在通过细胞分级分离将细胞器分离出来之前，这些亚细胞器的生化功能是无法研究的。20 世纪 40 年代后期，George Palade 和他的同事们证实，大鼠肝匀浆可以通过差速离心分为几个部分。由于不同细胞器形状、大小及在溶液中密度的不同，因此沉降速度也不同。例 1.7 介绍了一个典型实验。

例 1.7

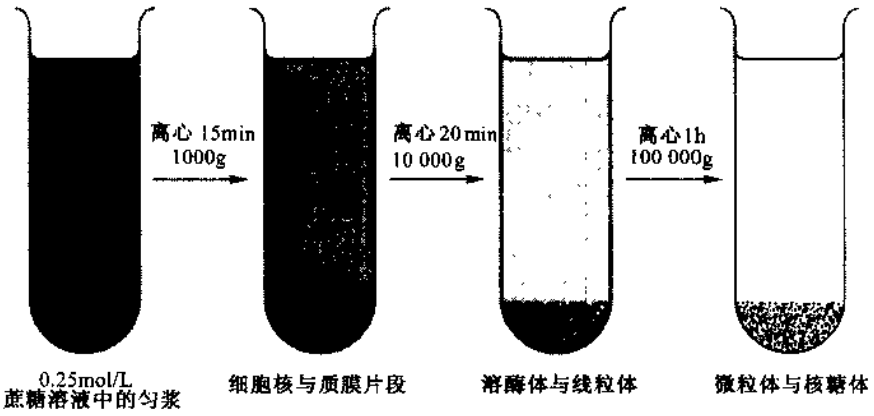


图 1-1 通过细胞匀浆的差速离心分离亚细胞器

把肝放于 0.25mol/L 的蔗糖溶液中，在一玻璃筒（Potter-Elvehjem 匀浆器）中用一旋

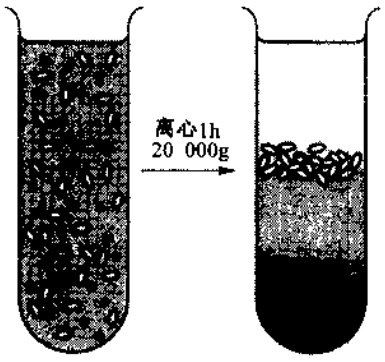


图 1-2 细胞器的等密度离心。阴影部分表示增加的溶液密度

转、紧密的活塞将其打碎。要小心不要在匀浆时把细胞器破坏。接着，将样品离心（图 1－1）。用 7cm 的样品管，以 1000g 离 15min，细胞核最先沉降至样品管的底部。

用 10 000g 高速离心 20min，会产生主要由线粒体组成的沉淀，但其中也掺杂有溶酶体。继续用 100 000g 离心 1h，产生的沉淀是核糖体和包含内质网的微粒体。经过这一步后，可溶性蛋白和其他溶质被留在了上清液（上层溶液）中。

密度梯度离心（亦称作等密度离心）也可以用于分离不同的细胞器（图 1－2）。匀浆在不连续或连续的蔗糖溶液浓度梯度中被分层，离心至亚细胞颗粒与其环境溶液达到密度平衡。

问题：是否可以用与等密度离心相似的方法分离不同的大分子？

可以。事实上，在基因工程中，就有一种方法使用不同的 CsCl 密度梯度来制备和纯化 DNA 片段。然而，达到平衡所需的时间要长很多，并且，所需的离心速度也比分离细胞器要高得多。

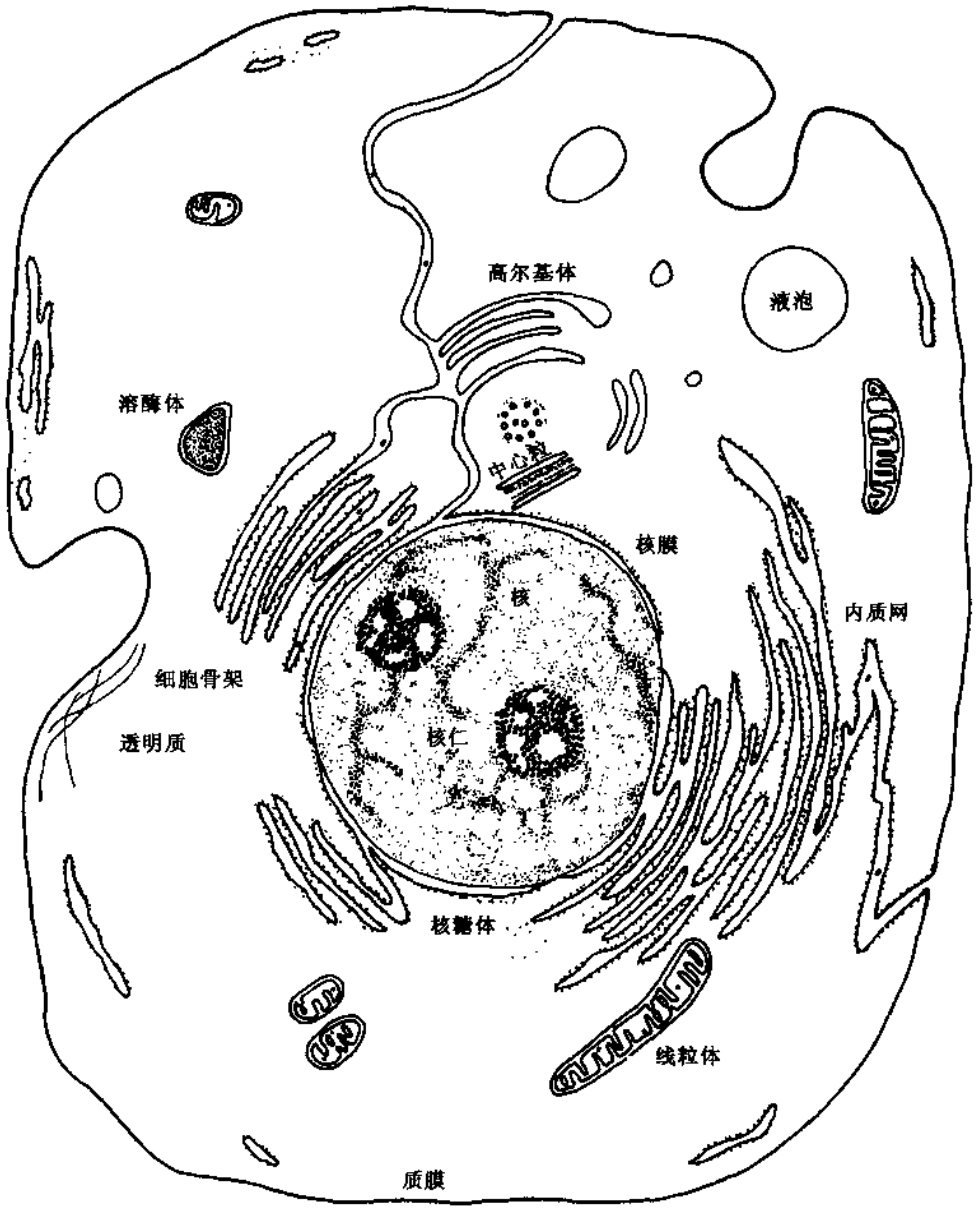


图 1－3　哺乳动物细胞图示。其中细胞器为近似的相对大小

1.3 亚细胞器

问题：典型的动物细胞是什么样子？

由于细胞的整体大小、形状及不同细胞器的分布都是不同的，所以不存在一个典型的动物细胞。而图 1－3 是一个合成图，它表明了不同微体的相对大小。

质膜

质膜（图 1－4）是细胞的外层边界，它是一个由连续的脂质分子（见第 6 章）构成的厚为 4～5nm 的双分子层，其中镶嵌了各种不同的蛋白质。蛋白质可以作为酶、结构组分、分子泵及允许特定小分子进出细胞的选择性通道，此外，蛋白质还可以作为激素和细胞生长因子的受体（见第 6 章）。

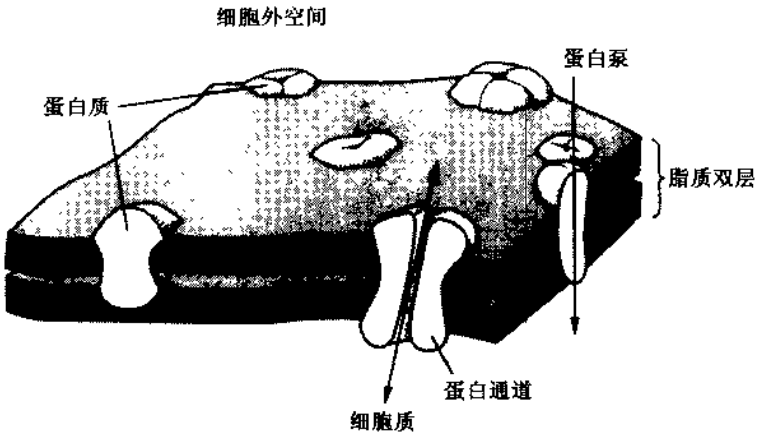
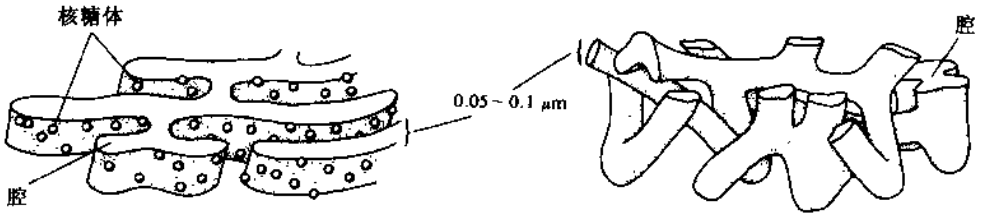


图 1－4 质膜

内质网

内质网（ER）是由膜状双分子层形成的扁平囊和管组成的，它遍及细胞质，包绕了大量的胞内空间。腔内空间（图 1－5）是连续的，且其膜与核膜（图 1－10）的外膜相连。它与蛋白质的合成及其运输至细胞质膜（通过囊泡，具有双层外膜的小的球形颗粒）相关。粗面内质网（RER）具有扁平的膜质囊，在其外（朝向细胞质）表面上点缀着核糖体（在本章的后面将会讨论），核糖体可合成蛋白质（见第 17 章）。滑面内质网（SER）的连接部分更接近于管状，也没有核糖体。它在脂类代谢中起着重要作用（见第 13 章）。



(a) 粗面内质网　　(b) 光滑内质网

图 1－5

例 1.8

肝细胞脂质膜中质膜所占的质量比例大约是多少?

大约 10%，其余部分主要是 ER 和线粒体膜。

高尔基体

高尔基体是一个由膜性扁平囊叠聚而成的囊状系统，扁平囊以宽度递减的顺序排列（图 1－6)。在该系统周围有许多小泡（直径为 50nm 或更大)。这些小泡是分泌囊泡，其中包含有由细胞释放的蛋白质（见例 1.6)。

外分泌腺细胞通过分泌泡分泌蛋白及糖蛋白(带有碳水化合物的蛋白质）的途径已经被了解得很清楚了，但不同细胞器的膜间确切交换的途径却还知道得很少，可能是图 1－7 中所示的一种或两种途径的结合。

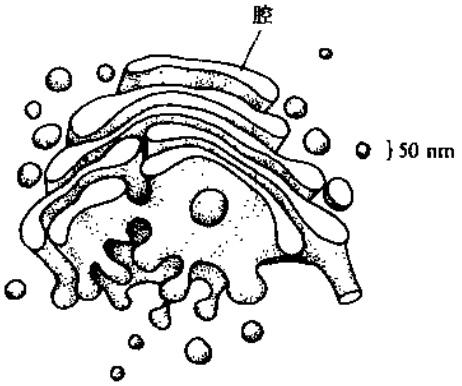


图 1－6　高尔基体和分泌囊泡

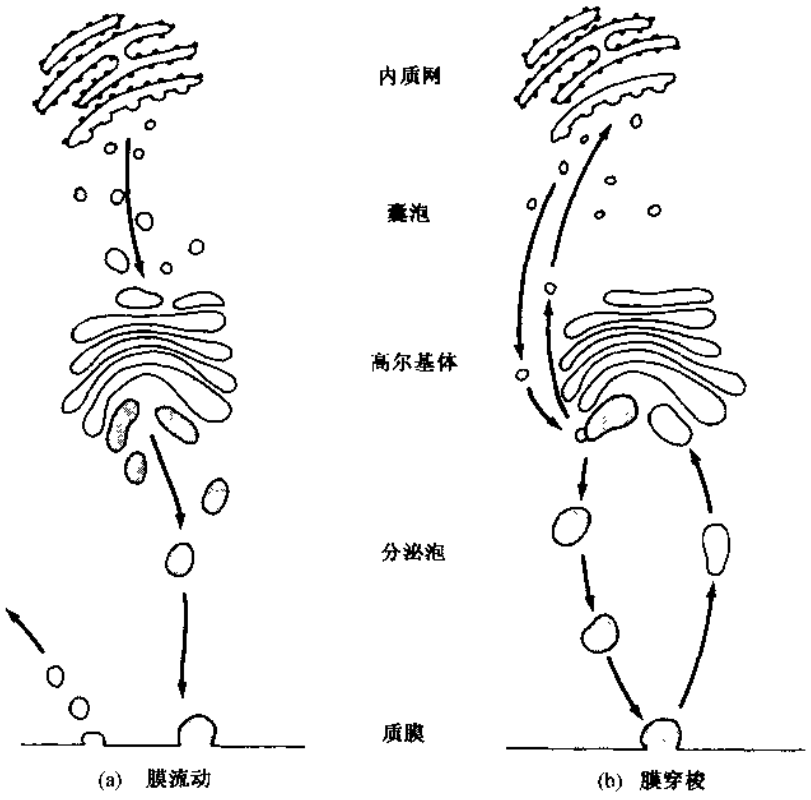


图 1－7　在细胞分泌蛋白质的过程中可能的膜交换途径

在图 1－7 膜流动模型中，膜穿过细胞，从 ER→高尔基体→分泌囊泡→质膜。在膜穿梭模型中，囊泡在 ER 和高尔基体间穿梭，而分泌囊泡在高尔基体和质膜间往返穿梭。

问题：是什么控制着膜性细胞器定向的流动?

没有人确切知道这个答案。这是细胞生理学中尚未完全了解的奇迹之一。

溶酶体

溶酶体是由膜包围的囊状结构，它包含着酸性水解酶。这些酶催化水解反应，在这些细胞器中其最适 pH 值约为 5。溶酶体的大小为 0.2～0.5nm，它们是胞内消化（自吞噬）及对胞外物质进行消化（异吞噬）的工具。异吞噬包括清除体内细菌，这一过程是从质膜形成凹陷开始的，称为内吞作用。图 1－8 显示了整个的消化途径。

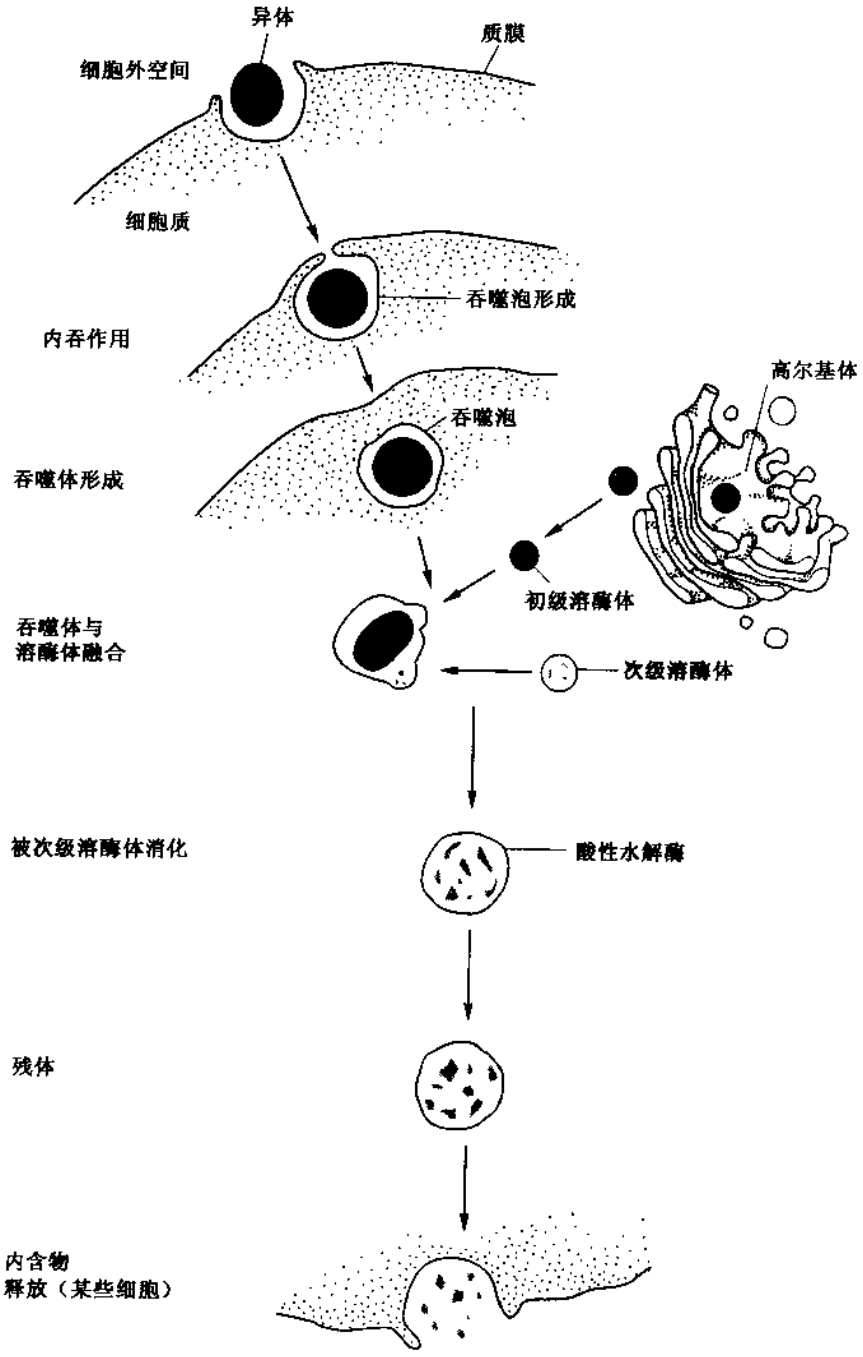


图 1－8　典型哺乳动物巨噬细胞的异吞作用

所有生物物质的消化都与溶酶体有关，这可以由整个细菌内所有不同类型大分子的破坏来证明。因此，在溶酶体内发现大量不同的水解酶也就不足为奇了。这些酶催化核酸、蛋白质、细胞壁碳水化合物及磷脂膜的水解（见表 1.1）。

表 1.1　哺乳动物溶酶体内的酶及其作用底物

酶	天然底物	组织部位
蛋白酶		
组织蛋白酶	大部分蛋白质	大部分组织
胶原酶	胶原（见第 4 章）	骨
肽酶	肽（见第 3 章）	大部分组织
脂酶		
一些酯酶	脂肪酸酯（见第 13 章）	大部分组织
磷脂酶	磷脂（见第 6 章）	大部分组织
磷酸酶		
酸性磷酸酶	磷酸一酯（如 2-磷酸甘油酯）	大部分组织
酸性磷酸二酯酶	寡核苷酸	大部分组织
核酸酶		
酸性核酸酶	RNA（见第 7 章）	大部分组织
酸性脱氧核酸酶	DNA（见第 7 章）	大部分组织
多糖酶及黏多糖酶		
β-半乳糖苷酶	膜半乳糖（见第 6 章）	肝、脑
α-葡萄糖苷酶	糖原（见第 11 章）	巨噬细胞、肝
β-葡萄糖苷酶	神经鞘糖脂（见第 6 章）	脑、肝
β-葡萄糖酸酶	多糖	巨噬细胞
溶菌酶	细菌细胞壁及黏多糖（见第 8 章）	肾
透明质酸酶	透明质酸及硫酸软骨素（见第 2 章）	肝
芳香基硫酸酯酶	有机硫酸	肝、脑

线粒体

线粒体是膜性细胞器（图 1-9），在细胞能量代谢中起重要作用。它们是绝大多数 ATP（见第 12 章）的来源场所，也是许多代谢反应发生的场所。特别是，它们包含着三羧酸循环（见第 12 章）及电子传递链（见第 14 章）所需的酶。电子传递链包含了细胞内大多数的需氧反应。一个哺乳动物肝细胞约有 1 000 个这样的细胞器。细胞质容量的约 20% 为线粒体。

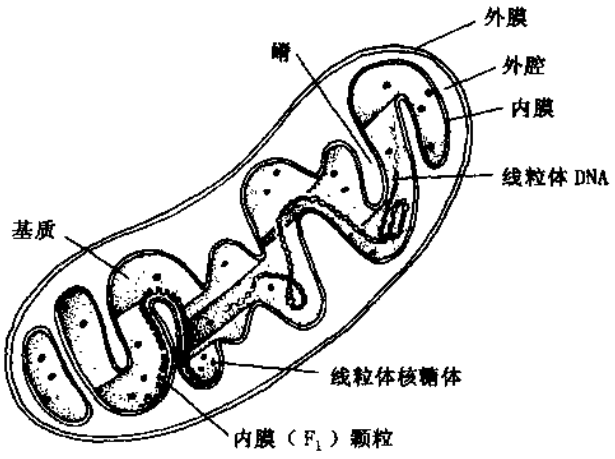


图 1-9　线粒体

例 1.9

1890 年，R. Altmann 首先发现了线粒体。他推测，它们和叶绿体（植物中含有叶绿素的细胞器）可能分别来自细菌和海藻，是胞内的共生生物，所以将其命名为原生粒。这个观点直到最近发现了线粒体核酸之前，一直受到驳斥。

在组织学上，线粒体可以被超活染色，即功能性的细胞器及细胞的代谢活动可以被选择性的染色。染料詹纳斯绿 B 的还原形式是无色的，而当其被线粒体氧化后，在光镜下呈现出鲜艳的绿色。

线粒体的大小与细菌相似，直径约为 0.2～0.5μm，长 0.5～0.7μm。它们由脂质双层膜所包围，内膜高度折叠。这些折叠被称为嵴，线粒体最内部的空间被称作基质。它们有自己的 DNA，这些 DNA 以环状双螺旋（至少有一个拷贝）的形式存在（见第 7 章），总直径为 5μm。线粒体 DNA 在密度与变性温度上不同于核 DNA，这是由于其具有更丰富的鸟嘌呤和胞嘧啶（见第 7 章）。与和 DNA 在密度上的不同使得它们可通过等密度离心分离。线粒体也有自己的核糖体，这些核糖体与细胞质中的不同，但与细菌中的相似。

线粒体中的大部分酶是从细胞质中运输来的，大多数的酶蛋白被核 DNA 编码（见第 17 章）。这些酶位于线粒体内不同的特定区域（表 1.2），与某些代谢过程的进行方向有着重要关系。

表 1.2 线粒体中酶的分布

位　置	特点或参照
外膜	
单胺氧化酶	神经递质，分解代谢
鱼藤酮不敏感 NADH-细胞色素 c 还原酶	见第 4 章
犬尿氨酸羟化酶	色氨酸分解代谢；见第 15 章
脂肪酸辅酶 A 连接酶	见第 13 章
内外膜间的空间	
腺苷酸激酶	AMP + ATP　2ADP
核苷二磷酸激酶	XDP + YTP　XTP + YDP　X、Y 代表任一核苷
内膜	
呼吸链酶	见第 14 章
ATP 合成酶	见第 14 章
琥珀酸脱氢酶	见第 14 章
β-羟丁酸脱氢酶	见第 13 章
肉碱脂肪酸酰基转移酶	见第 13 章
基质	
苹果酸及异柠檬酸脱氢酶	见第 12 章
延胡索酸酶及乌头酸酶	见第 12 章
柠檬酸合成酶	见第 12 章
2-氧酸脱氢酶	见第 12 章
β-脂肪酸氧化酶	见第 13 章
氨甲酰磷酸合成酶 I	见第 15 章
尿氨酸氨甲酰转移酶	见第 15 章

过氧化物酶体

过氧化物酶体的大小、形状都与溶酶体相似（直径 0.3～1.5μm）。但是，它们并不含有水解酶，而含有氧化酶。氧化酶可以催化许多与氧结合的化合物产生过氧化氢。这些以高浓度（甚至达到可以形成蛋白结晶的浓度）存在的酶包括：①尿酸氧化酶（除人类以外的许多动物）；②D-氨基酸氧化酶，见第 15 章；③L-氨基酸氧化酶；④α-羟酸氧化酶（包括乳酸氧化酶）。同样的，细胞中的过氧化氢酶也是包含在过氧化物酶体中的，这种酶催化其他反应产生的过氧化氢转变为水和氧。

细胞骨架

在细胞质中，特别是与质膜相连的部分具有由蛋白纤维组成的网状结构，它们的作用是固定脂膜，维持细胞形态。在成长和分裂的细胞，如肝细胞中，细胞骨架是在一个近核并包含一对中心粒（见第 5 章）的区域形成的。细胞骨架纤维主要有三种类型：①微管，直径 25nm，由有序聚集的微管蛋白（见第 5 章）组成；②肌动蛋白纤维，直径 7nm（见第 5 章）；③所谓的中间纤维，直径 10nm（见第 5 章）。

中心粒

中心粒是一对中空的圆柱体，由 9 束 3 个一组的微管蛋白组成（见第 5 章）。中心粒的两个圆柱体互相垂直。在细胞分裂（有丝分裂）过程中，微管形成网状蛋白结构，附着在染色体上。该网状结构称为有丝分裂纺锤体，附着在中心粒的末端。中心粒在染色体有丝分裂分离过程中起作用，它对高等植物细胞没有任何意义。高等植物细胞的这一过程是在没有中心粒的情况下进行的。

核糖体

核糖体是蛋白质合成及存在的场所：①细胞质中玫瑰花形的组构——**多核糖体**（在未成熟血红细胞中，一般是 5 个一组）；②位于 RER 外表面；或③位于线粒体基质。第三种类型与细胞质中的核糖体在形状与大小上都不同。核糖体由 RNA 和 15－20nm 大小的蛋白质组成。它们在蛋白质合成中的作用将在第 16 章中介绍。

例 1.10

核糖体最初是通过差速离心后，在电子显微镜下发现的。由于这个发现和 20 世纪 50 年代的一些相关工作，George Palade 在 1975 年获得了诺贝尔奖。曾经有一段时间，电子显微镜学家把核糖体称为 Palade 微粒。

细胞核

细胞核是细胞中最显著的细胞器（图 1－10）。它被核膜包围，从而与细胞质分开。核膜实际上是由扁平囊组成的双层膜结构，上面有核孔（直径为 60nm），用以进行核质与细胞质之间的物质运输。细胞核内有染色体，它是通过 DNA 与等量组蛋白（见第 16 章）结合，

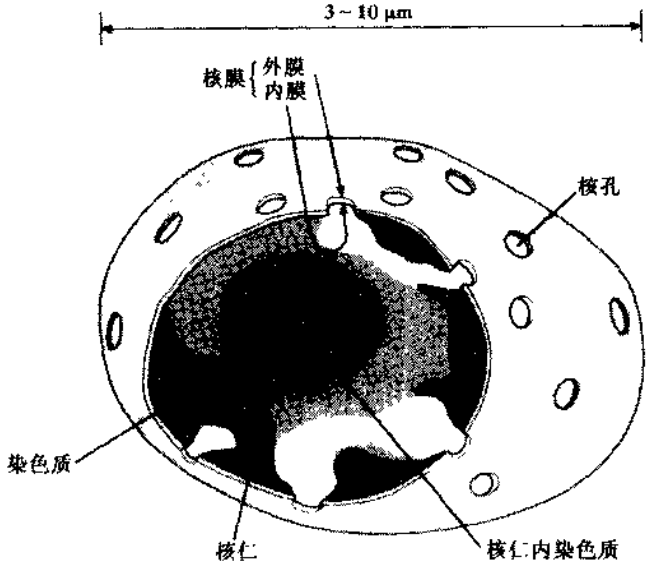


图 1－10　哺乳动物细胞核

包装成染色质纤维而形成的。

核仁

核仁中有5%～10%为RNA，其余的物质为蛋白质和DNA。在光学显微镜下呈球形，为嗜碱性（见问题1.1）。其功能是合成核糖体RNA（见第17章）。一个细胞核中可能有多个核仁。

染色体

染色体是细胞中遗传信息的载体，因此，它们是细胞活动的整体调节者。染色体重要特征有：

(a) 染色体数量。在动物体内，每个体细胞（不包括性细胞）包含从母本和相应（纯合子）父本继承来的各一套染色体，这两套中染色体的个数被称为二倍体数。"倍体"是指一套，而"二"是指套数。性细胞（配子）的染色体数只有体细胞的一半，因此被称为单倍体。基因组是指相当于一个物种单倍体的全套染色体。

例1.11

人类体细胞有46个染色体，牛为60，果蝇为8。因此，半倍体数与种在系统发育体系中的分类没有关系。

(b) 染色体形态。染色体只有在处于核分裂周期的特定阶段才可以在光学显微镜下观察到。基因组中的每个染色体一般都是可以通过以下特点与其他区分的：①整个染色体的相对长度；②着丝粒的位置，着丝粒将染色体分为有两对不等臂长的交叉结构；③被称作染色粒的球状染色质的存在；④被称作随体的末端延伸小段（图1－11）。

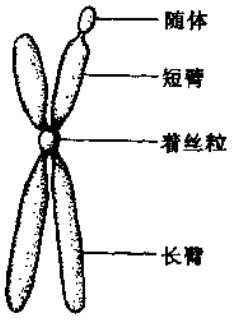


图1－11 哺乳动物染色体

例1.12

在对可能带有先天代谢或形态异常的婴儿或胎儿进行临床研究时，经常会制备核型。通常，先将白细胞培养，再刺激其分裂。将分裂前的细胞在玻璃片间压碎，使细胞核释放出染色体，并用染料染成蓝色。将染色体摄像，按长度排列，最长的一对为一号。性染色体不编号。遗传性疾病唐氏综合征（也称为先天愚型）具有智力迟钝症状和明显的面部特征。它是由于体内每个体细胞多了一个额外的21号染色体。因此，这种情况称为21三体性。

(c) 常染色体和性染色体。在人类中，性别与被称作性染色体的一对具有特殊形态的染色体有关。这对染色体中的两条分别被称为X和Y。其中，X染色体要大一些。Y染色体上的遗传因子决定了男性。除性染色体以外的所有染色体都被称为常染色体。

1.4 细胞类型

在人体中，有200多种不同的细胞类型。组织是由多种方式形成的，通常是不同类型细胞的混合。在大量不同类型的细胞中，有一些已被高度特化了。

红细胞（红血球）

与其他细胞相比，红血球个体小，形态独特，为两面内陷的圆盘形（图1－12）。它们没有细胞核，因为核在细胞从骨髓中释放到血液之前就被挤出细胞了。骨髓是造细胞的场所。红血球的细胞质中没有细胞器，而是充满了结合着O_2和CO_2的血红蛋白。细胞质中也

存在着其他蛋白质，它们是：①膜下细胞骨架；②糖酵解途径及戊糖磷酸途径的酶（见第 11 章），还有一些其他水解酶和特殊功能酶，这里不做介绍。在膜上，存在着与阴离子的运输，及碳水化合物细胞表面抗原（血型物质）有关的特定蛋白质。

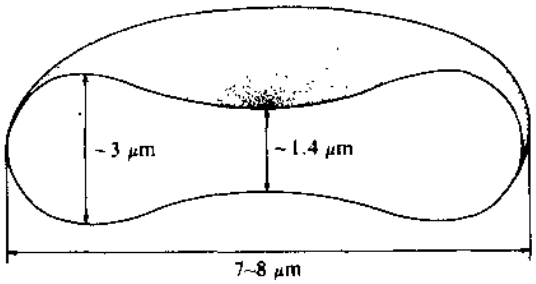


图 1－12　人类血红细胞

脂肪细胞

脂肪细胞是脂肪组织的特定细胞（图 1－13）。这类细胞的直径为 60～120μm，特点是含有充满甘油三酯的大囊泡（见第 6 章）。核与线粒体都位于质膜内侧，呈扁平状。其所含内质网的数量很少。

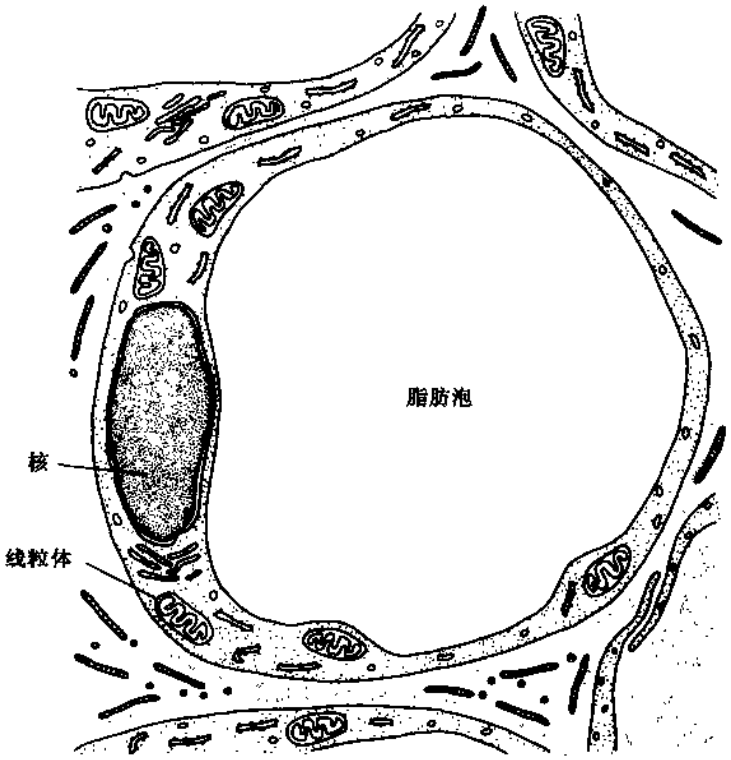


图 1－13　脂肪细胞

肝细胞

肝组织含有许多类型的细胞，但数量上最多的是肝细胞。肝细胞的整体结构与图1－3所示非常相似。它们约 20 个一组，排成长的分枝状，位于胆汁通道的横截面周围。细胞将胆汁分泌到这些通道内。肝是尿素（见第 15 章）的主要分泌部位，并储存糖原（见第 11 章），合成其他组织所需的许多氨基酸，生产血清蛋白。此外，肝还具有很多其他代谢功能。

肌细胞

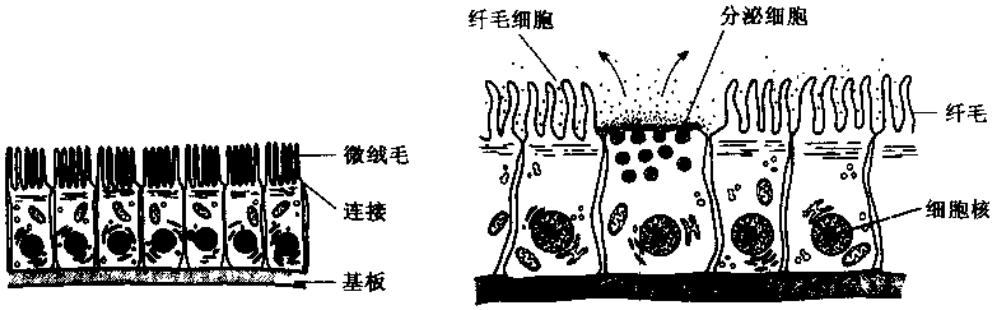
肌细胞通过收缩产生机械动力。在脊椎动物中，主要有三种基本类型：

1. 骨骼肌带动与关节相连的骨。这些肌肉是由长的多核细胞束组成的。细胞质内有高浓度的大分子收缩蛋白复合体——肌动球蛋白（见第 5 章），还含有具有高浓度 Ca^{2+} 的复杂的网状膜结构——肌浆网。在显微镜下，收缩蛋白复合体呈带状。

2. 平滑肌是血管壁及肠壁的细胞类型。细胞长，成纺锤状。与骨骼肌不同，细胞不成束。
3. 心肌是心脏的主要组织。细胞与骨骼肌细胞相似，但实际上，它们具有不同的生化特性。

上皮细胞

上皮细胞（图 1－14）形成了机体内外表面的连续层。它包含许多特定种类，主要的几种如下：



(a) 吸收细胞　　(b) 纤毛细胞和分泌细胞

图 1－14　上皮细胞

1. 吸收细胞的外表面有大量毛发样的突出体，称为微绒毛，它们提高了表面积，有利于从肠腔和其他部位吸收营养。
2. 纤毛细胞具有膜结构小突起（纤毛），纤毛内含有收缩蛋白。纤毛同步摆动，以扫除呼吸道，即肺和鼻内侧表面上的异体颗粒。
3. 分泌细胞存在于多数上皮表面，如皮肤的汗腺细胞，肠和呼吸道黏液分泌细胞。

1.5　细胞结构层次

构成生物大分子的有机分子是非常小的。例如，丙氨酸只有 0.7nm 长，而包含 574 个氨基酸的典型球蛋白血红蛋白（见第 5 章）直径约为 6nm。同样，蛋白质与合成它们的核糖体相比也很小（见第 17 章），这些大分子聚集体是由 70 多种不同蛋白质和 4 种核酸链组成的。它们的相对分子质量（M_r）约为 2.8×10^6，直径约为 20nm。相反的，线粒体具有自己的核糖体和 DNA，其 DNA 最大直径可达 7μm。胞内的空泡看上去与线粒体大小一样，而高尔基体或脂肪细胞内的脂肪泡则大得多。细胞核可以更大，也具有一些核糖体和其他的大分子聚集体，其中包括最重要的染色体。

尽管构成大分子的材料与细胞相比很小（如，一个丙氨酸分子体积与血红细胞相比约为 $1:10^{11}$），但蛋白质中一个氨基酸顺序有误，不仅会对蛋白质，甚至会对细胞结构都造成严重影响。而且，一个改变的酶促反应或结合力可以严重影响细胞，甚至整个生命体的生存。

例 1.13

在人类中，存在着一种遗传疾病——镰状细胞贫血。这种疾病患者的红血球内的血红蛋白分子发生缺陷，蛋白质 574 个氨基酸中有两个被其他氨基酸所代替。血红蛋白四聚体两条β链上的第 6 位谷氨酸都被缬氨酸所代替。这个变化提高了分子脱氧时聚集的可能性。聚集的蛋白质在细胞内形成了大的次晶态结构，使细胞成为相对不易弯曲镰刀形。这种细胞容易阻塞小血管和毛细血管，从而造成许多器官缺氧。而且，它们也更脆弱易破裂，使细胞数量减少，造成贫血。

问题解答

研究细胞结构和功能的方法

1.1 像次甲基蓝或甲苯胺蓝这样的碱性染料，在组织学通常所用的染液 pH 值时带正电。这样，染料就结合到酸性（解离掉一个质子后带负电）物质上。这些酸性分子也因此被称为亲碱性物质。请举出几个亲碱性物质的例子。

答：

亲碱性细胞组分的例子有 DNA 和 RNA，后者包括信使 RNA（见第 7 章）及核糖体。在血液循环中，最年轻的血红细胞的细胞质内有一个亲碱性网，这是由信使 RNA 及核糖体 RNA 组成的。在循环中，这个网状结构在该细胞生命的前 24h 后缓慢溶解。这个很易识别的血红细胞称为网织红细胞。

1.2 像曙红和酸性品红这样的酸性染料，在通常的染料溶液 pH 值时带净负电。因此，它们与细胞内许多带净正电的蛋白质结合。请说出肝细胞中哪些区域可能是亲酸性的。

答：

细胞质、线粒体基质和滑面内质网的内侧是亲酸性的，这些区域基本上只含有蛋白质。

1.3 试描述一条可以对 6－磷酸葡萄糖酶进行细胞化学检测和定位的方法。该酶存在于肝中，可以催化下面的反应：

$$6\text{-磷酸葡萄糖} \xrightarrow{H_2O} \text{葡萄糖} + \text{磷酸}$$

答：

在 37℃条件下，将组织切片与 6－磷酸葡萄糖在一适当的缓冲液中一同孵育。将组织上的底物洗去，再往组织切片上加硝酸铅，以沉淀磷酸离子。沉淀残留物在例 1.5 中已介绍过了。在肝细胞中，这一反应的产物可以在内质网中找到，从而显示了酶所在的位置。

1.4 若想通过离心分离亚细胞器，应如何破碎细胞？

答：

这里有几条破碎细胞的途径：

1. 渗透溶胞：细胞质膜对水有通透性，但对大分子及一些离子是不可通透的。因此，如果将细胞放入水中或稀释的缓冲液中，它们会由于水的渗透作用而膨胀。因为质膜不能被延伸很多（血红细胞膜最多只能被延伸其原来大小的 15%，否则就会破裂），所以细胞破裂。该方法对已分离的细胞有效，但不适用于组织。
2. 匀浆器：例 1.7 中已经介绍过一种。
3. 超声波：在细胞样品附近用一钛探针（直径 0.5nm，长 10cm）以约 20 000Hz 振动，从而产生破碎力。这种仪器包括一个压电铅锆钛晶体，当电子振荡器对其进行振荡时，它会发生伸长和收缩。超声压力波使样品产生许多小腔，从而破裂细胞。这一过程一般只需几秒。

亚细胞器

1.5 在异吞噬途径（图 1－8）的基础上，提出线粒体自吞噬降解的途径。

答：

图 1－15 表明了一个线粒体自吞噬降解的方案。注意，一旦所谓的吞噬体形成后，消化过程等就与异吞噬一样了（图 1－8）。

1.6 有一种遗传病，患者溶酶体缺少 β－葡萄糖苷酶（表 1.1）。这种缺陷的临床及生化结果是什么？

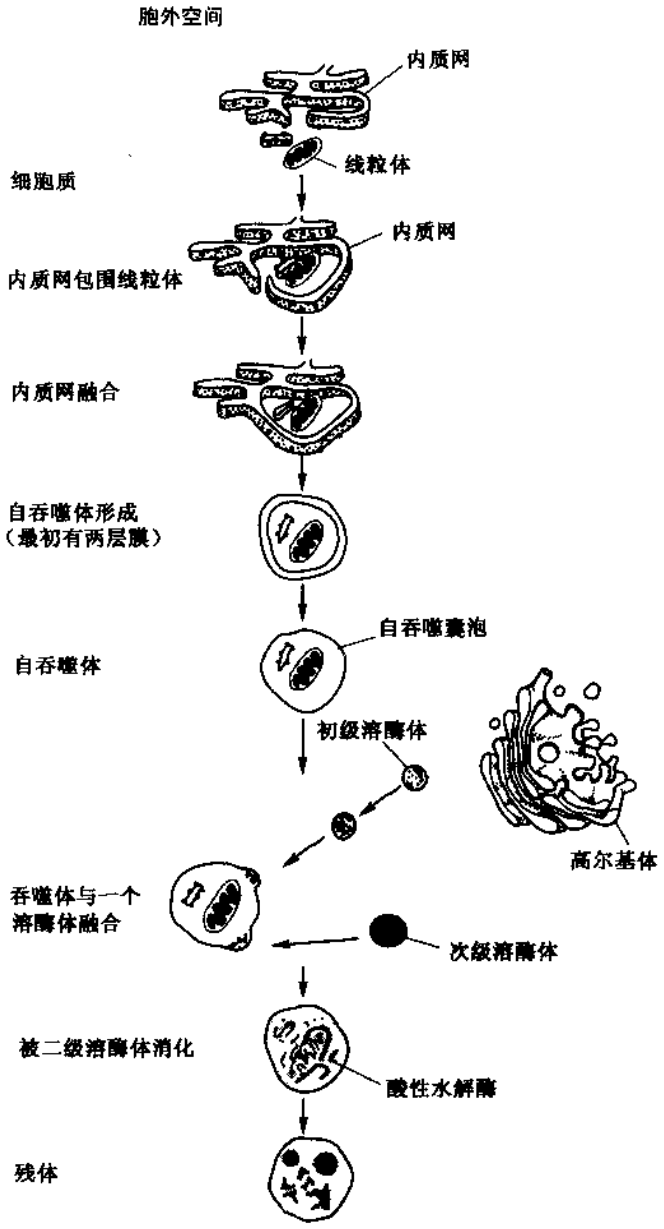


图 1－15　线粒体自吞噬过程

答：

这种疾病被称为高雪氏病，是最常见的是鞘脂沉积病，在人群中的发病率约为 1∶2 500。这种病是由于称作糖鞘脂（见第 6 章）的膜的组分不能被水解，在正常情况下，该物质是被细胞溶酶体的水解作用分解的。糖鞘脂是带有碳水化合物的脂分子。由于不能将葡萄糖从分子上去除，导致了这些分子在溶酶体内的积累。事实上，几年后，如肝、脾等具有更新质膜的细胞会由于这种脂降解产物积累而变大。在临床上，患者表现为肝大、脾大。如果脑中也积累了许多脂，还可能表现出智力损伤。

细胞类型

1.7　一个 70kg 的人有多少红细胞？

答：

一般人有约 3.3×10^{13}个红细胞，血的总量约为 6L，其中有一半为红细胞，即 3L 红细

胞。因为每个细胞为 90×10^{-15}L（图 1－12），细胞数量是由 3L 除以这个数得到的。

1.8　如果人类红细胞平均寿命一般为 120 天，那么，一个 70kg 的人每秒钟生产多少个红细胞？

答：

每秒生产 320 万个红细胞。这个数据是由上题（1.7）答案除以 120 天的秒数。

1.9　巨噬细胞是一类吞噬细菌及损伤的宿主细胞等外源物质的细胞。就这种特定的吞噬功能而言，你认为用电子显微镜观察该细胞横截面，可以看到些什么？

答：

巨噬细胞的主要特点是巨大的溶酶体和细胞质膜上出现孔道（图 1－16），还有丰富的生产溶酶体水解酶的粗面内质网。由于高度活跃的蛋白质合成非常需要 ATP（见第 17 章），它还具有大量的线粒体。

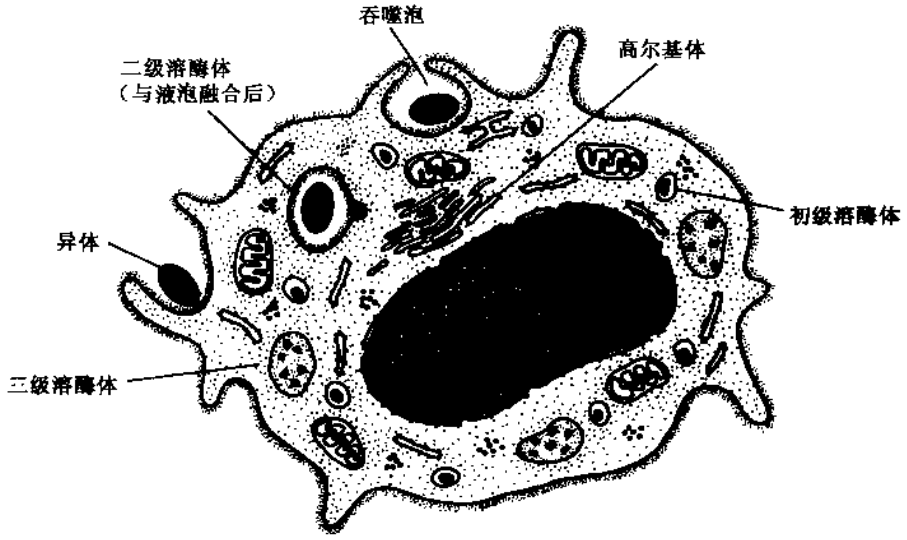


图 1－16　巨噬细胞

1.10　红细胞经 PAS 染色，在显微镜下观察，细胞膜只有一侧被染为粉色。是细胞外侧还是内侧？

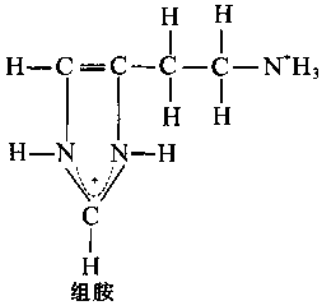
答：

胞外一侧为粉色。红细胞和其他所有细胞质膜的糖蛋白及糖脂都位于细胞外侧，质膜内侧没有低聚糖。

1.11　为什么含有大量组胺的肥大细胞小泡经曙红染色为红色？

答：

曙红带负电，组胺结构如下：



它带有两个正电荷。两种分子在小泡中发生相互的静电作用，所以曙红将小泡染为红

色。

细胞的结构层次

1.12 人体红细胞中血红蛋白的浓度一般为 330g/L，相对分子质量（M_r）为 64 500。一个红细胞体积约为 90fL。一个人类红细胞中含有多少血红蛋白分子？

答：

约 3×10^8 个血红蛋白分子/ 红血胞。一个细胞中血红蛋白摩尔数是

$$330\times90\times10^{-15}/\ 64\ 500=4.6\times10^{-16}$$

阿佛加德罗数是指一摩尔化合物所含分子数，上一步的结果可以用阿佛加德罗常数表示，从而放大到要求的估计值：

$$4.6\times10^{-16}\times6.02\times10^{23}\approx3\times10^8$$

1.13 一个红细胞从干细胞到成熟网织红细胞的平均生长时间约为 90 小时。合成大部分血红蛋白的细胞生长阶段约 40 小时。那么，一个血红细胞每秒合成多少个血红蛋白分子？

答：

在问题 1.12 中我们已经看到，一个红细胞含有约 3×10^8 个血红蛋白分子，我们只要将这个数据简单的除以生成所需时间——40 小时，即可得到生成速率，约为每秒 2 000分子。

1.14 据估计，由氨基酸合成一个血红蛋白亚基的时间约为 1 分钟。利用这个事实计算在细胞分化的任一阶段平均产生多少血红蛋白分子？

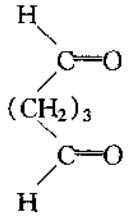
答：

由问题 1.13 我们已知，每秒钟产生约 2 000 个血红蛋白，即每分钟 1.2×10^5 个。然而，血红蛋白是一个四亚基蛋白（见第 5 章），因此，每分钟合成的亚基链数为 4 乘以 1.2×10^5，为 4.8×10^5。

补充问题

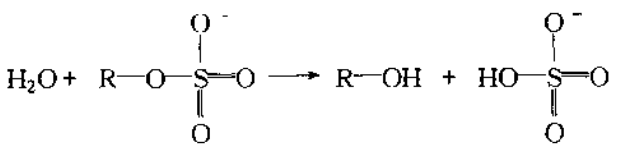
1.15 在组织培养中常用的测试细胞活性的方法是看其是否含有所谓的超活染料，如甲苯胺蓝。如果细胞排斥这种染料，则被认为是活细胞。这种测试方法的生化基础是什么？

1.16 化合物戊二酸具有如下结构：



它被作为光学显微镜及电子显微镜的组织固定剂。在该固定过程中，包含哪些化学反应？

1.17 概括说明用来定位组织中芳香基硫酸酯酶的组织化学过程。该酶催化如下反应类型：



芳香基硫酸酯酶

1.18 在定位肝糖原的过程中，如果用［^{3}H］葡萄糖作为糖原放射性前体分子，解释电镜自显影图像时是否会出现问题？

1.19　微粒体是与核糖体相连的球状膜质小泡。在大功率离心差速沉降中，它们只有在后期才会沉淀。在电镜下观察细胞是看不到它们的。它们是从哪里产生的？

1.20　氨甲酰磷酸合成酶有两种形式，一是存在于线粒体基质中，另一种是在细胞质中。酶区域化的结果和作用是什么？

1.21　人类网织血红细胞（见问题 1.1）在进入血液循环后，连续 24h 合成血红蛋白。设计一个利用自显影技术在电镜下观察那些细胞正在活跃合成蛋白质的方法。

1.22　(a) 你的线粒体 DNA 是来自你的母亲还是父亲？

(b) 如果父母亲中有一人的线粒体有缺陷，推测一下可能的遗传方式。

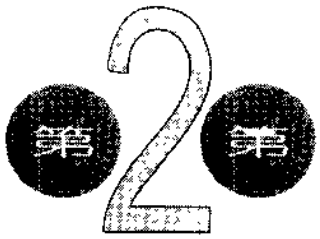
1.23　线粒体不像溶酶体那样具有自动水解的能力，那么，这个复杂的膜质结构存在的意义是什么？毕竟，内质网和质膜都可以提供在线粒体膜上发现的酶。

1.24　表皮松解水泡病的症状是皮肤溃疡，甚至会出现耳、鼻、手指末端缺失。这可能是由于溶酶体膜的稳定性出现重要问题的结果。

(a) 这种疾病的症状是怎么产生的？

(b) 提出一种治疗该疾病的生化方法。

1.25　在某些唐氏综合征患者体内，体细胞核内没有 3 个 21 号染色体，却存在着与 21 号染色体有关的染色体缺陷。这种缺陷可能是什么？



碳水化合物

2.1 导言和定义

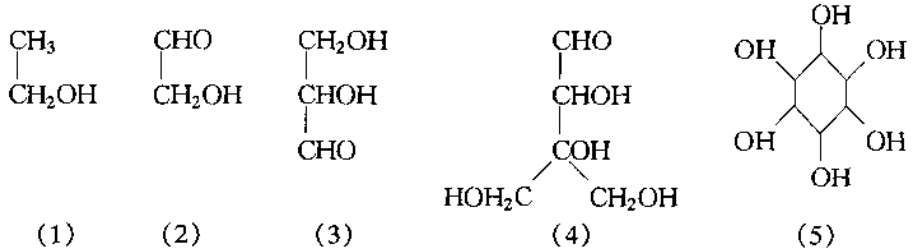
对于碳水化合物，我们无法给出一个简单定义。碳水化合物这个名称最初用于描述这样一类化合物，即它们都包含 C、H 和 O，可用分析式 $(CH_2O)_n$ 表示，也即从表面上看，在化合物中，n 个碳原子与 n 个水分子水合。这些化合物由于带有酮基或醛基，以及带有丰富的羟基而具有还原性。从广义上讲，碳水化合物这个术语用于描述上述简单化合物的衍生物，然而这些衍生物却无法给出如上的简单分析式。进一步说，许多天然产物的还原性基团（醛基或酮基）虽已发生反应，但仍被证明是碳水化合物的衍生物。

碳水化合物最简单的定义是：它们为聚羟醛或聚羟酮或为聚羟醛、聚羟酮的衍生物。它们的相对分子质量（M_r）少则低于 100，多则高于 10^6。较小的化合物含有 3～9 个碳原子，称作单糖；较大的化合物是由较小的化合物通过糖苷键连接形成的。如二糖是由一个糖苷键相连的两个单糖组成的，三糖是由二个糖苷键相连的三个单糖组成的等等。寡聚糖或多聚糖分别是指相应的碳水化合物中含有较少个数或许多个数的单糖单位。

由于许多单糖和寡聚糖带有甜味，所以低分子质量的碳水化合物通称为糖。

例 2.1

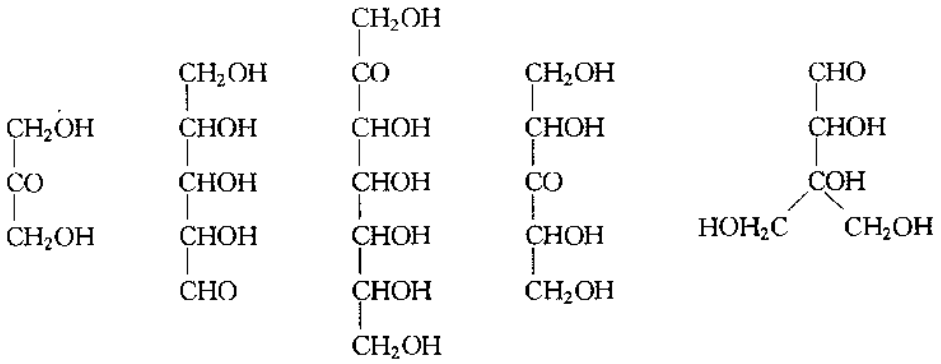
下列所示化合物中，(1) 和 (2) 不是碳水化合物（因两者都只有一个羟基）；(3)、(4) 和 (5) 是碳水化合物（因它们具有通式 $(CH_2O)_n$，且有多个羟基）。



我们现在仅限于讨论单糖，即含有一个羰基官能团的多羟基化合物。单糖分为两大类：一类是醛糖（含有一个醛基）；一类是酮糖（含有一个酮基）。简单的单糖也可根据它们所含的碳原子数（如分别含有 3、4、5、6 个碳原子）相应称作丙糖、丁糖、戊糖、己糖，以此类推。以上两类命名系统可以结合。因此，最常见的糖——葡萄糖，是己醛糖，也就是含有一个醛基的六碳单糖。

例 2.2

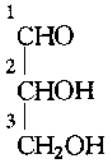
以下是单糖的结构与其对应的名称：



丙酮糖　戊醛糖　庚酮糖　戊酮糖　戊醛糖

2.2　甘油醛

最简单的醛糖是甘油醛：

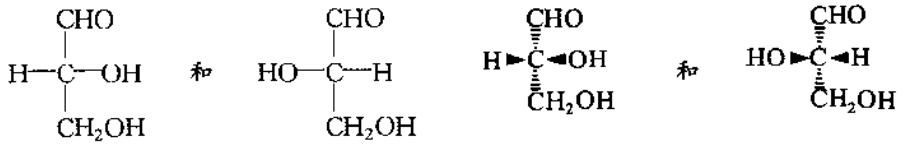


由于醛基的存在，甘油醛具有还原性。其 C－2 原子是其分子的手性中心（也称作不对称中心），这是指，甘油醛有两个可能的异构体，或称为对映体。

例 2.3

甘油醛的两个对映体结构如下：

甘油醛结构以左下图的方式表示，称费歇尔投影式，此投影式是在二维平面中表示三维立体分子。两个分子在实际三维空间的形状见下图（右）：



图中，C－2 原子在纸平面中，醛基和羟甲基在纸面后（虚线表示），氧原子和羟基在纸面上（实线表示）。对映体互为镜像：即当把其中一个放在一面镜子前时，镜中影像的结构与之完全相同。

上图一对对映体中，左边化合物称 D－甘油醛，右边化合物称 L－甘油醛。前缀 D－和 L－说明整个分子的形状，更具体的说，前缀表明基团在手性中心周围的构型或排列。

通常，只有一个手性碳原子的化合物，其对映体之间仅有微小的物理和化学性质差异。然而有一个物理性质在其对映体之间是非常不同的，这就是光活性。光活性是指对映体溶液旋转偏振光偏振平面的能力。用（＋）号表示对映体中的一个按顺时针方向旋转偏振光平面，用（－）号表示对映体中的另一个按逆时针方向旋转偏振光平面。甘油醛的 D－对映体顺时针旋转偏振光（＋），因此完整表示为 D－（＋）－甘油醛，由此另一个为 L－（－）－甘油醛。D 和 L 对映体混合物的旋光能力依混合物中对映体比例而定，比例相同时，净旋光度为零，在此状态下的溶液称为消旋溶液。

光学活性可用旋光计来测定。旋光性大小用测得的旋转角度表示，符号为 d，单位用度

或弧度表示。

问题：光活性混合物溶液的旋光度α是由何因素决定的？

决定因素有溶液浓度，盛溶液的测量池光径长度，偏振光波长，温度，溶剂

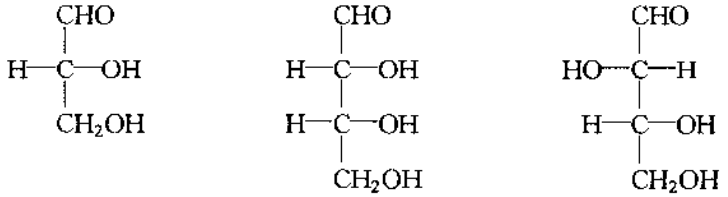
由于以上因素的影响，实验测得的α值常转化为旋光率 $[\alpha]_D^T$ 表示，这里上、下标分别表示温度和光的波长（D表示钠蒸气D线波长589.2nm）。

$$[\alpha]_D^T=\frac{\alpha}{\text{测量池光径长度（dm）}\times\text{浓度（gcm}^{-3}\text{）}} \tag{2.1}$$

溶剂名称在旋光率值后面的括号中给出，如：$[\alpha]_D^{25}=+17.5°$（水中）。

2.3 简单醛糖

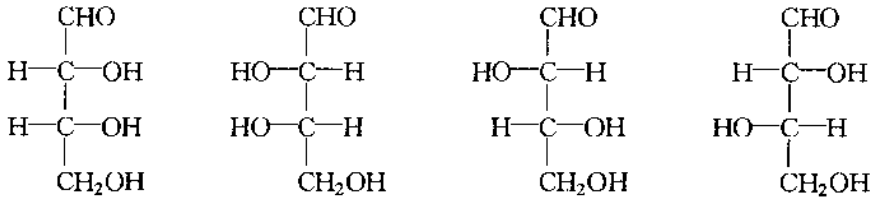
简单醛糖的结构D-和L-与甘油醛相关，它们可认为是在甘油醛分子C-1和C-2原子之间引入含羟基的手性碳原子而衍生得到的。因此CHOH引入D-甘油醛可得到两个丁糖。



D-甘油醛　　D-赤藓糖　　D-苏阿糖

问题：从L-甘油醛可得到两个丁糖，分别是L-赤藓糖和L-苏阿糖，为什么不需要创造新名称命名从L-甘油醛衍生得到的丁糖？

如果用费歇尔投影式将这两个丁糖结构表示在D-赤藓糖和D-苏阿糖旁边，就给出了两对镜像，即四个丁醛糖包含两对对映体，如下图

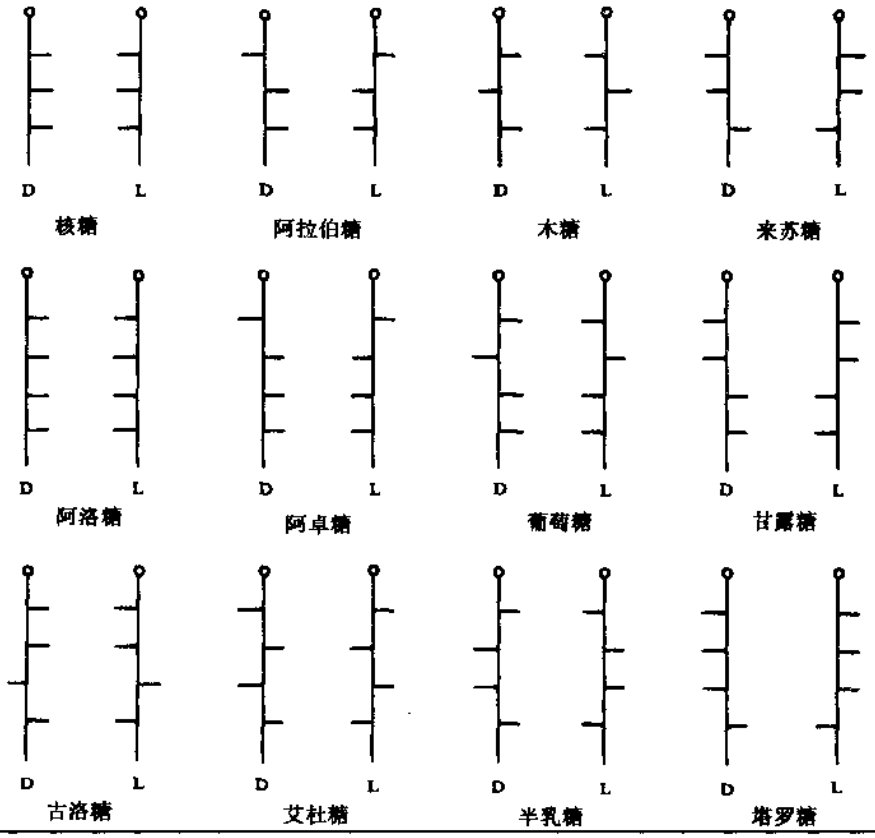


D-赤藓糖　　L-赤藓糖　　D-苏阿糖　　L-苏阿糖

以上四个丁醛糖中任何一个都可从其结构上衍生出两个戊醛糖，因而总共可产生8个戊醛糖，以此方式可产生16个己醛糖。

例2.4

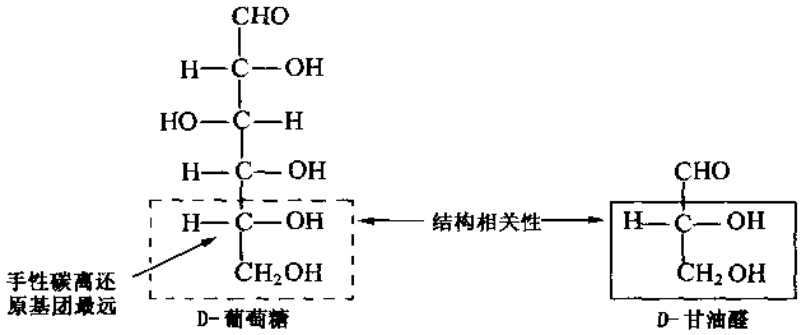
8个戊醛糖和16个己醛糖的简化结构表示如下（其中。代表醛基，—代表—OH基，省略了碳上的H原子）：



问题：甘油醛有时也叫甘油糖，为什么？

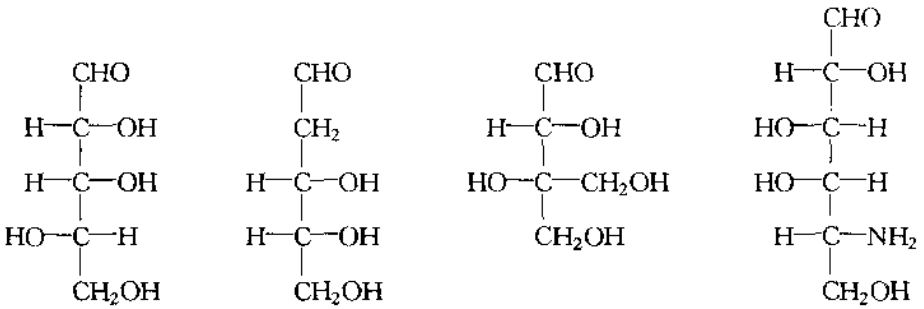
英文名称中，所有丁醛糖、戊醛糖和己醛糖都是以－ose结尾，而甘油醛是醛糖的母体，因此甘油醛也可称作甘油糖。

简单的醛糖有D-和L-两个系列，为了确定某一醛糖的归属，应首先用离还原基团最远的手性碳原子与甘油醛结构相比较，明确它与甘油醛的关系。例如：下面所示的葡萄糖是D-葡萄糖：



例 2.5

在以下所示的糖中，(1) 是L型，(2)、(3) 和 (4) 属D型。注意：(3) 中最远离还原基团的手性碳原子是C-2。



(1)　(2)　(3)　(4)

甘油醛只有一个手性中心，然而，丁醛糖、戊醛糖、己醛糖分别有 2、3、4 个手性中心，每个手性中心都有光学活性，因此，净光学活性的（+）或（-）将视每个手性中心的贡献而定。

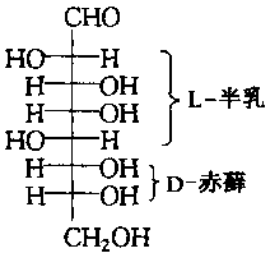
问题：当 D-赤藓糖溶于水中，你能预测其溶液的光学活性是（+）还是（-）吗？

无法预测，因为前缀 D-和 L-指的是分子的形状，并无任何有关光学活性的提示。事实上，D-赤藓糖溶液的光学活性为（-）。

当分子中存在多于 4 个手性碳原子时，将用两个构型前缀来表示醛糖，一个表示低序号的 4 个手性中心，另一个表示其余的部分。高序号的构型部分需首先说明。

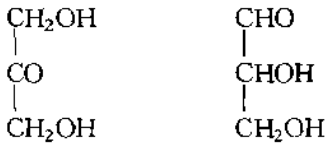
例 2.6

下图所示的辛醛糖的名称是 D-赤藓-L-半乳辛糖。



2.4　简单酮糖

从结构上讲，简单酮糖的母体是二羟基丙酮，其是甘油醛的异构体。

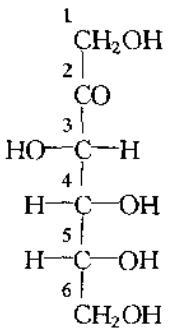


二羟基丙酮　　甘油醛

虽然二羟基丙酮没有手性碳原子，但在其酮基和一个羟甲基之间引入羟基化的手性碳原子可得到其他简单酮糖。从而可衍生得到 2 个丁酮糖，4 个戊酮糖和 8 个己酮糖。

例 2.7

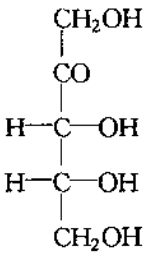
右图所示的是最常见的酮糖，D-果糖。试将离酮基最远的手性碳原子的构型与 D-甘油醛作比较。



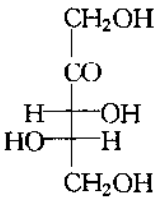
例 2.7 中所示的果糖这一叫法早在确定其结构之前就已使用了。对大多数醛糖也是如此。象葡萄糖、甘露糖、核糖、果糖等都是俗名，也就是非系统命名。作为相应醛糖的异构体，酮糖是从相应的醛糖中分离或合成出来的，它们的命名依据的是其相应的醛糖异构体。由于这样的名称并不反映酮糖中的结构元素，因此容易产生误导。

例 2.8

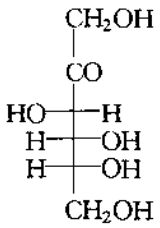
右图中的酮糖由于是 D-核糖的异构体，因此一般称作 D-核酮糖。但这样的命名是不确切的。在此化合物中，只有两个手性中心而并不是如前缀核（rib）所指的那样有三个手性中心。这个化合物与 D-赤藓糖相关，正确的名称是 D-赤藓-戊酮糖。



问题：下面两种糖的系统命名是什么？



(1)



(2)

(1) L-苏阿-戊酮糖，通常叫 L-木酮糖

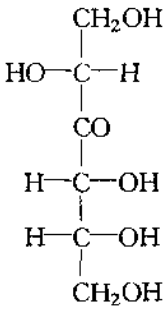
(2) D-阿拉伯-己酮糖，通常叫 D-果糖

问题：从名称如何确定一个单糖是否为酮糖？

除果糖外，酮糖的系统名称是以酮糖（-ulose）结尾的。对俗名也是如此。

有些酮糖的结构与二羟基丙酮无关，它们的命名忽略了酮基，是通过考虑所有的手性碳原子而命名的。

例 2.9



左图中的酮糖有三个手性碳原子（尽管它们被一个酮基隔开了），具有 D-阿拉伯糖的构型，此酮糖共有六个碳原子，酮基位于第三个碳原子上，因此称其为 D-阿拉伯-3-己酮糖。

如果酮糖的名称中未表明酮基的位置，则二羟基丙酮为这个酮糖的母体，酮基的位置在 2 位。

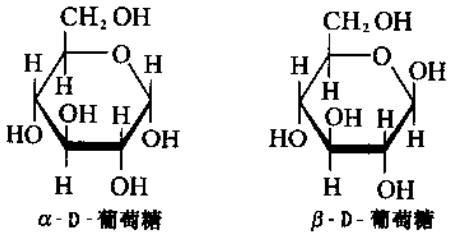
问题：为什么在醛糖中不需要用数字指出羰基的位置？

因为醛基必须在碳链的一端。

2.5 D-葡萄糖的结构

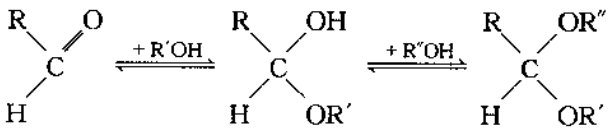
D-葡萄糖是最常见的单糖，它以自由状态存在于动物血液中，还可以聚合态存在，特别是存在于淀粉和纤维素中。植物及可进行光和作用的微生物每年可产生出数千万吨这样的多糖。基于这些原因，人们已对葡萄糖的结构进行了仔细研究，因此所有单糖的许多结构特征可以用葡萄糖为例加以说明。

D-葡萄糖的费歇尔投影式（例 2.3）为其开链或直链结构，这种结构仅存在于溶液中。结晶状态时 D-葡萄糖有 α 和 β 两种结晶形态。当其溶解后也同样具有不同的光学活性。用 X 射线衍射研究证实，α 和 β-D-葡萄糖中包含一个由五个碳原子和一个氧原子组成的环状结构。

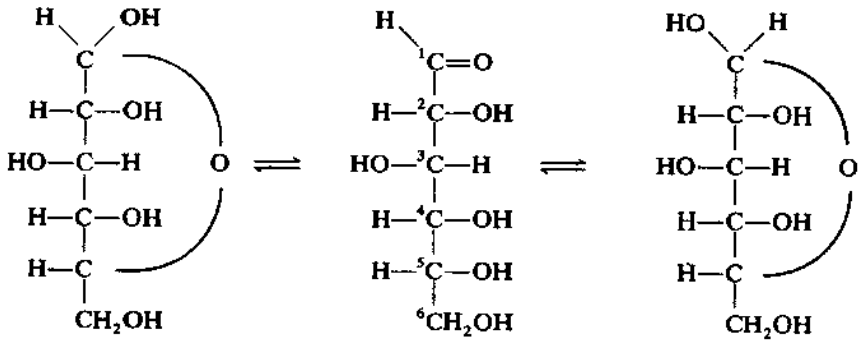


这种结构称哈沃斯透视式。它并不代表分子的真实形状，只表示每个手性原子的构型。这种分子式代表环平面在纸平面上所处的位置。在透视图中，环中加重的三个键表示其在纸平面的前面，剩余的三个键以及氧原子则在纸平面的后面。

当 α-D-葡萄糖或 β-D-葡萄糖溶于水后，环便打开形成开链结构。这样的反应是可逆的。同时在开链结构和两种环状结构之间形成平衡。这个过程的化学机理可以用醛类的化学行为来理解。总之，醛与醇可逆的反应生成半缩醛，然后在酸存在下（第 8 章）进一步形成缩醛。



由开链结构生成环状结构可以认为是 C-5 上的羟基与醛基反应生成半缩醛的结果。由此，醛基碳原子也具有了手性，因此形成两种半缩醛结构 α-和 β-D-葡萄糖。这些半缩醛互为异头体，环中 C-1 原子称异头体碳。



半缩醛（α-D-葡萄糖）　　半缩醛（β-D-葡萄糖）

问题：为什么异头异构体碳有时也称作潜在还原性碳？

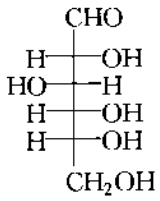
当在溶液中环打开时，C－1变为醛基碳原子，具有还原性。仅在开链结构中才具有还原性，在环状结构中由于缺少醛基而无还原性。

哈沃斯透视式是表示上面平衡中环状结构的简明方法，并表示出了其中每个手性碳原子的构型。将单糖的开链结构改写为哈沃斯环状结构并不困难。

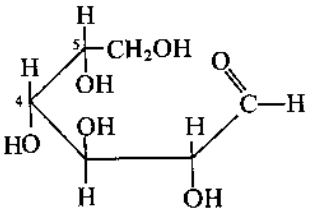
例2.10

将开链结构的糖转化为哈沃斯环状结构最好逐步进行，直接转化是不可靠的。以D－葡萄糖为例：

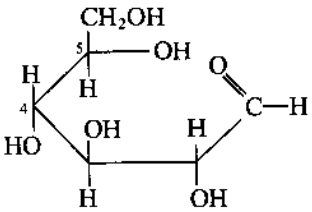
1．写出开链结构。



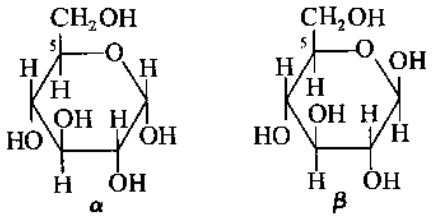
2．将其顺时针旋转至水平，然后向里弯曲接近环状。



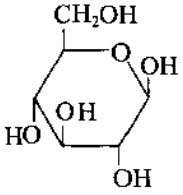
3．旋转C－4—C－5键，使C－5上的羟基接近羰基。



4．C－5上的羟基与羰基键合生成半缩醛。



注：通常糖的环状结构中与碳原子相连的H原子可以省略。这种情况下，β－D－葡萄糖可以写为：



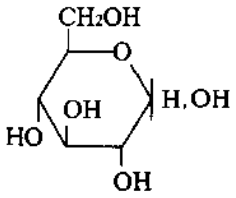
问题：例 2.10 中如何确定哪个异头体为 α 型，哪个为 β 型？

这是由异头体碳的构型与 D 或 L 系列的单糖中（对葡萄糖来说是 C－5）的一个手性碳原子的构型决定的。在费歇尔投影式中，如果这些碳原子的羟基为顺式结构，这样的异头体为 α 型；如果这些羟基为反式结构，则为 β 型。比较例 2.10 中步骤（2）与（4）中糖的结构，在成环前 C－5 上的羟基在环面下，因此，异头体羟基在环面下方的异头体为 α 型。

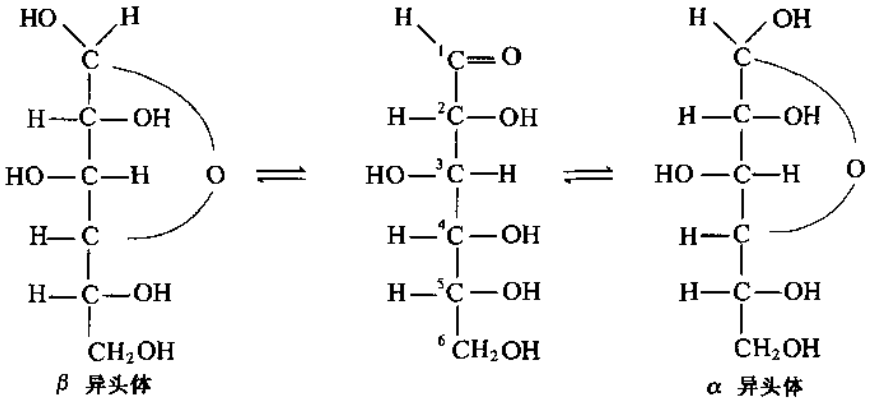
在开链结构中，葡萄糖有四个手性中心，而形成环后生成第五个手性中心，因此两种异头体具有不同的旋光活性。当固态 α－D－葡萄糖溶于水后其 $[\alpha]_D^{25}$ 是 +112°，而当 β－D－葡萄糖溶于水后的 $[\alpha]_D^{25}$ 是 +19°。

例 2.11

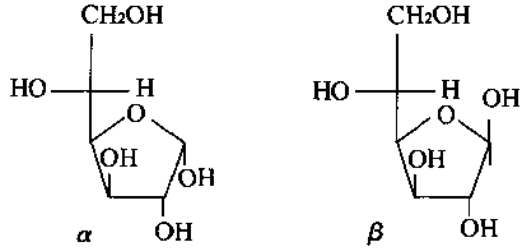
α－D－葡萄糖和 β－D－葡萄糖的新配水溶液的旋光活性随时间变化，称为“变旋现象”。旋光活性的变化意味着结构的变化。α－D－葡萄糖溶于水，在刚溶解时，溶液中仅存在 α－D 异头体，但此时在溶液中开环反应慢慢进行，且由于反应是可逆的，因此溶液中会出现一些 β－D－葡萄糖异头体及其开链形式。最终，反应会在开链结构和两种异头体之间建立一个平衡，这时的 $[\alpha]_D^{25}$ 是 +52°。由于此原因，用下面的结构描述葡萄糖在溶液中的状态，并用同样的结构来表示尚不知道异头体碳构型的糖结构。



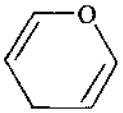
虽然我们认为 D－葡萄糖的异头体形式包含六元环，但通过开链结构中 C－4 上的羟基与醛基的加成也可能产生另外两种异头体形式，它们是五元环形式。



问题：如何将开链形式的葡萄糖转变成五元环的哈沃斯透视式？并指定投影式的 α 和 β 形式。



很明显，区分六元环和五元环很必要。这是通过扩展葡萄糖的名字来做到的。六元环的异头体叫吡喃型葡萄糖，五元环的叫呋喃型葡萄糖。


吡喃

呋喃

问题：对给定的糖来说，你能预测呋喃型糖和吡喃型糖哪个更稳定？

通常呋喃糖稳定性较小，因为其环面积较小，在不同碳原子上的H、羟基和羟甲基的空间位阻作用较大。对葡萄糖来说，在平衡混合物中，α和β-呋喃葡萄糖的贡献很小。

2.6　葡萄糖的构象

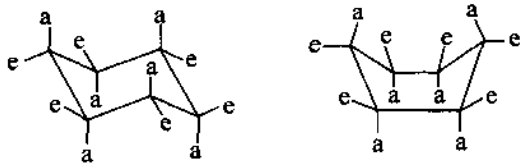
前一节中已强调，D-葡萄糖异头体的哈沃斯结构并不代表环的真实形状。葡萄糖上碳原子都是饱和的，最稳定的形式将是没有环张力的一个构型，即：每个碳原子上的键角均为109°的四面体角。

例 2.12

为简化起见，仅考虑环己烷（不表示出H原子）。环己烷只有两种无张力构象，分别是椅式构象和船式构象。

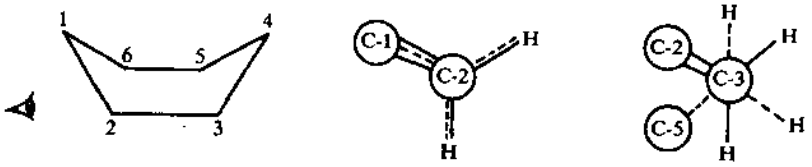
C_6H_{12}
环己烷　　椅式构象　　船式构象

在结构中有12个H原子：6个在环平面内称平伏键（e），6个垂直于环平面，称竖直键（a）



椅式和船式构象可以通过C—C键的旋转相互转变，因此它们不是异构体，而是用构象异构体来描述一个分子的各种可能的形状。

虽然环已烷的两种构象体都是无张力的，但椅式构象比船式构象更稳定。有两方面原因：①在船式构象的六个C—C键中有两个重叠，而在椅式构象中无重叠。如图2-1所示，从（a）的位置，使眼睛沿着C-2—C-3键的方向望过去，可看到图2-1中（b）所示的构型：C-2和连在其上的H原子以及连着C-1的键；而看不到C-3及它的两个H原子，这是因为这三个原子正好在C-2和它的两个H原子的后面。同样，C-5—C-6键也是重叠的，而所有船式构象中的其他C-C键及椅式构象中的所有C—C键是交叉的。例如图2-1的（c）表示眼睛顺着C-3—C-4键方向看所看到的情况。因此在船式构象中，C-2、C-3、C-5、C-6上的四个竖直键上的H原子将尽可能地靠近，并且它们之间的使环扭曲的相互作用是最大的。②在船式构象中，C-1和C-4上的竖直H原子间距位0.18nm，接近它们的范德华半径之和（0.24nm），两个原子间存在的作用力，趋于使环扭曲。



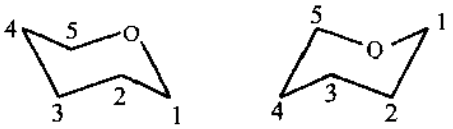
(a)　　(b)　　(c)

图 2-1

环已烷的船式构象和椅式构象间的能量差是 25kJmol^{-1}，这意味着在 25℃时，1 000个分子中只有一个分子是以船式构象存在的。

问题：单糖（例如葡萄糖）的环结构与环已烷在构象上有哪两方面不同？

(1) 单糖中羟基和羟甲基取代了环中碳原子上的 H 原子，它们的体积比 H 原子的体积大很多，倾向位于围绕环边缘的水平位置，而不在环面上的竖直位置。这是因为若体积较大的基团占据竖直位，由于它们相距较近，相互间的较大作用力将导致环面扭曲。(2) 单糖中环上有一个氧原子取代了一个碳原子。虽然 C—O 键长比 C—C 键长稍短一些，但这对环形状的影响不大，氧上的键角仍是 109°。但是，由于环上一个氧原子的存在，意味着有两种可能的椅式构象异构体，即 C1 和 1C。



C1　　1C

C1 和 1C 不能重叠，但 C1 形状可以通过键的转动，经由船式构象可逆地转变为 1C 形状。

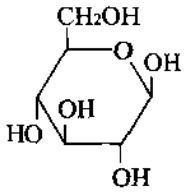
单糖的哈沃斯结构可以很方便地转变为表示分子真实形状的结构。

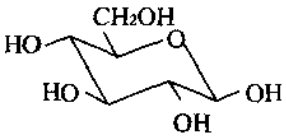
例 2.13

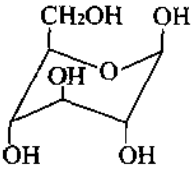
从哈沃斯结构式中可知：如果取代基团在单糖环平面的上方，则其一定也出现在椅式结构的平面上方。而其处于竖直键还是处于平伏键需依据碳原子来考虑。例如，依次观察 β-D-吡喃葡萄糖的每一个碳原子，我们可看到

取代基	在哈沃斯结构中相对于环的位置	椅式构象 *	
		C1	1C
C-1 OH	上面	e	a
C-1 H	下面	a	e
C-2 OH	下面	e	a
C-2 H	上面	a	e
C-3 OH	上面	e	a
C-3 H	下面	a	e
C-4 OH	下面	e	a
C-4 H	上面	a	e
C-5 OH	上面	e	a
C-5 H	下面	a	e

* e 表示平伏键；a 表示竖直键


哈沃斯透视式

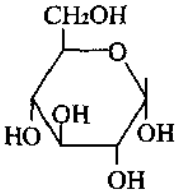

C1

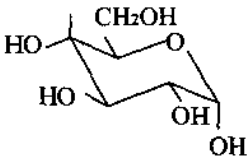

1C

C1 构象异构体是主要的，其中的所有较大体积取代基都在环边缘，处于平伏键上。而在 1C 构象异构体中，由于环面上三个大基团之间以及环面下两个大基团之间存在较大的空间位阻作用，将导致环面相当大的扭曲。

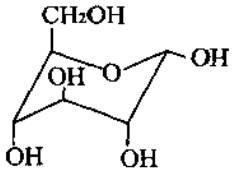
问题：对 α-D-吡喃葡萄糖，哪个构象异构体是主要的？

分析过程如例 2.13。C1 构象异构体是主要的。





C1



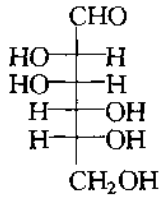
1C

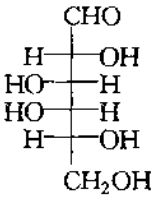
比较 α-D-吡喃葡萄糖和 β-D-吡喃葡萄糖的优势构象（都是 C1），可以看到 β 形式更稳定，其结构中没有处于竖直位的大取代基团，而在 α 形式中有一个大取代基团处于竖直位。这可以帮助我们解释为什么在葡萄糖水溶液中，β-D-吡喃葡萄糖是优势构象。

2.7 葡萄糖以外的单糖

己醛糖

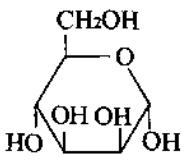
葡萄糖的两个结构异构体是甘露糖和半乳糖。

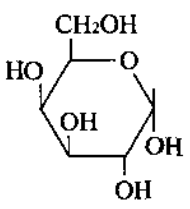

D-甘露糖


D-半乳糖

例 2.14

D-甘露糖和 D-半乳糖很容易改写成六元环的哈沃斯结构，下面仅给出它们的 α-构象异构体。

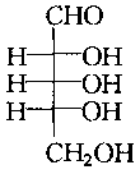

α-D-吡喃甘露糖


α-D-吡喃半乳糖

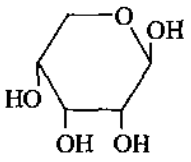
两者均为葡萄糖的差向异构体，即：在不考虑异头体碳的情况下，它们与葡萄糖在构型上只有一个碳原子不同——甘露糖是 C－2，半乳糖是 C－4。

戊醛糖

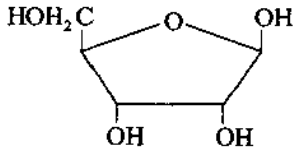
最常见的戊醛糖是 D－核糖，存在于 RNA 中。



问题：将 D－核糖写成五元环或六元环的哈沃斯结构，只需写出 β 型构象异构体形式。



β-D-吡喃核糖



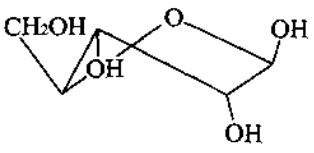
β-D-吡喃核糖

就目前所知，晶态的 D－核糖仅为 β－D－呋喃核糖，而在溶液中，吡喃糖和呋喃糖二者的 α 和 β 构象异构体都存在。

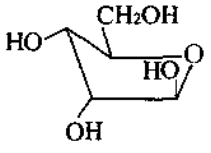
通常五边形的夹角为 108°，很接近四面角，由此可认为呋喃环的形状近似平面形。而一些具有呋喃环的糖，由于环上取代基团空间位阻排斥力大，使得其结构不是平面形。

例 2.15

我们注意到，在 β－D－呋喃核糖中，C－2—C－3 键上的羟基和 H 原子是重叠的，其间斥力可通过将环扭转到平面外而得到降低，即通过将 C－3 提高到平面上方同时将 C－2 降低到平面下方而得以实现。这种构象异构体称为 T_2^3（T 表示扭曲，C－3 上升，C－2 下降）。另一个减小斥力的替代方法是升高或降低 C－3 于环平面外，由此给出 E（信封状）构象异构体。



T_2^3

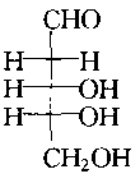


E^3

但 C－3 移出环面而减小的空间阻力不能补偿由其造成环稳定性的降低。

脱氧糖

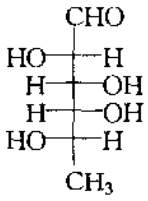
脱氧糖是糖的一种还原形式，糖上的一个羟基被一个 H 原子取代。分布最广的脱氧糖是存在于 DNA 中的 2－脱氧－D－核糖。



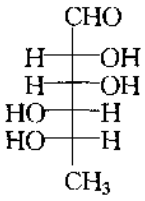
例 2.16

对许多脱氧酮糖的命名是不准确的。在所谓的 2-脱氧-D-核糖中，只有两个手性碳原子，此糖与 D-赤藓糖相关，其系统命名是 2-脱氧-D-赤藓戊糖。

常见的其他脱氧糖有，存在于动物体内 L-海藻糖以及存在于植物和细菌中的 L-鼠李糖。



L-海藻糖



L-鼠李糖

问题：以上所述的糖的系统命名是什么？

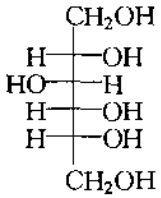
6-脱氧-L-半乳糖（L-海藻糖）和 6-脱氧-L-甘露糖（L-鼠李糖）

糖醇

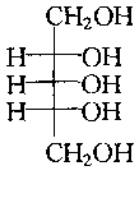
还原糖的另一不同种类是糖醇，即由一个醛糖的醛基被还原而得到的。例如：D-葡萄糖还原生成的糖醇是 D-葡萄糖醇（俗名是山梨醇）。糖醇的名称是通过在醛糖名称后加醇字而得到的（甘油醛的还原产物——甘油例外）。

例 2.17

下面给出两个糖醇。

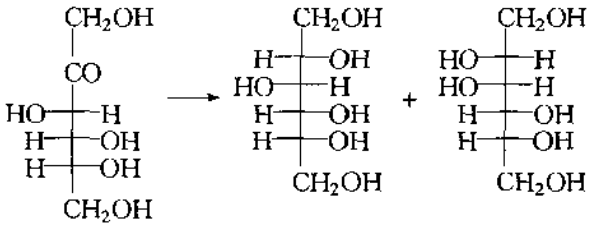


D-葡萄糖醇



D-核糖醇

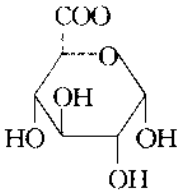
问题：D-果糖上的羰基还原生成的化合物的名称是什么？



D-果糖　　D-葡萄糖醇　　D-甘露糖醇

糖醛酸和糖酸

醛糖中的羟甲基被氧化成羧酸后所得的产物为糖醛酸，在生理 pH 值下以盐形式存在，称作糖醛酸盐。

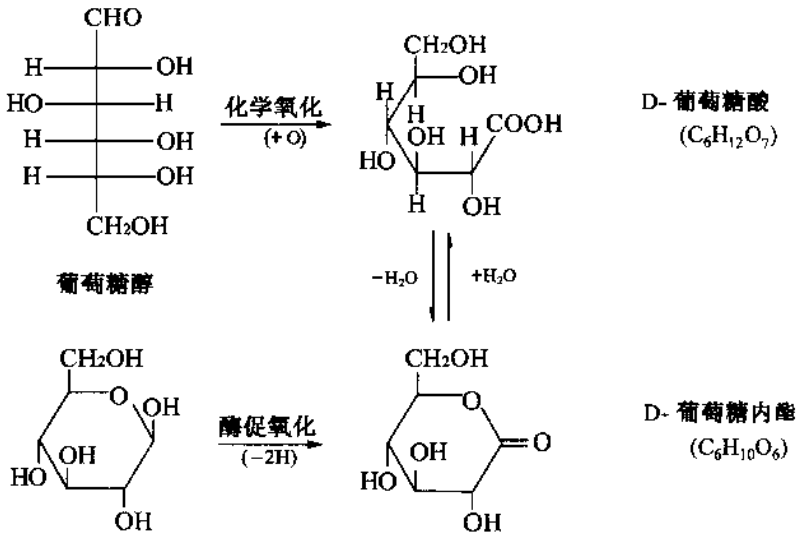


α-D-葡萄糖醛酸

醛糖中的醛基被氧化成羧酸基后得到的衍生物叫糖酸，在生理 pH 下也以盐的形式存在，称作糖酸盐。如果一个糖酸中包含五个或五个以上的碳原子，那么羧酸基与 C-5 上的羟基自发缩合生成 δ-内酯。

例 2.18

对葡萄糖，化学氧化发生在开链形式的 C-1 上，而酶催化氧化发生在糖环形式的 C-1 上。形成的糖酸以游离酸（开链形式）和 δ-内酯（环状）的平衡混合物的形式存在。



氨基糖

氨基糖广泛分布于自然界中。总体来说，它们是糖中的一个羟基被一个氨基取代而形成的。

例 2.19

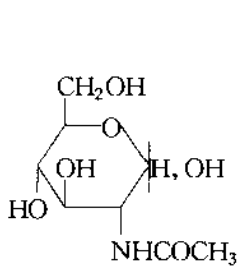
最常见的氨基糖是：

D-葡萄糖胺（2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖）

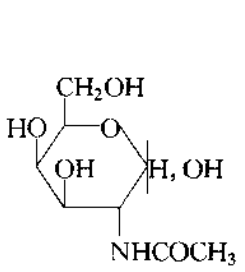
D-半乳糖胺（2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖）

神经氨糖酸，D-甘露糖胺的衍生物（2-氨基 2-脱氧-D-甘露糖）

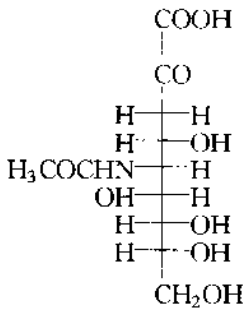
在这些化合物中，氨基通常被乙酰化。



N-乙酰-D-葡萄糖胺



N-乙酰-D-半乳糖胺



N-乙酰神经氨糖酸（唾液酸）

磷酸酯和硫酸酯

许多单糖及其衍生物在自然界中常以其中一个或多个羟基被磷酸或硫酸酯基所取代的形式存在。它们属于酯类。通常情况下，磷酸酯常作为代谢中间产物存在于细胞中，而硫酸酯存在于细胞外的单糖或多糖中。

例 2.20

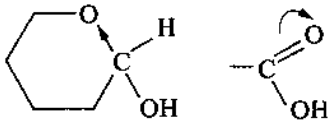
自然界中，单糖的两种磷酸酯和两种硫酸酯分别是1,6-双磷酸果糖酯和 6-磷酸葡萄糖酯（详见第 11 章）；以及 4-硫酸-D-半乳糖酯和 4-硫酸-*N*-乙酰半乳氨糖酯。

2.8　糖苷键

所有单糖和具有醛基或酮基的单糖衍生物（除糖醇和糖酸类衍生物外）都具有还原性。进而言之，具有适当碳原子数的糖可形成两种环形式（异头体），在此，我们称潜在的还原性碳为异头体碳。

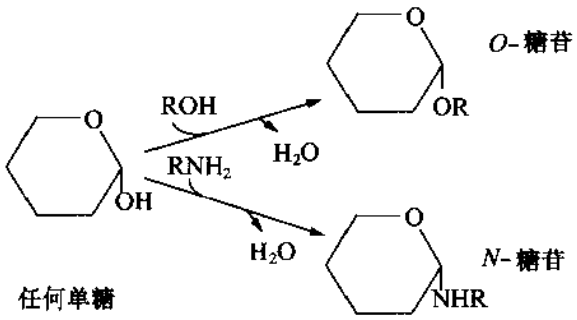
问题：在单糖中异头体羟基的反应活性与其他羟基相比如何？

它们比典型的一级或二级醇活泼。这种活性是由于环上氧的电子亲和性所导致的。此种情形可与由四个原子 C—O 和 O—H 组成的羧酸相比较。在单糖中，异头体碳、异头体碳上的 H 原子、O—H 原子和环上氧原子组成了相应的基团。



例 2.21

单糖与醇、单糖与胺类反应中异头体碳上羟基的反应性可方便的用图示表示出。在分子中，羟基通常不参加反应，而异头体羟基则参加反应，此过程称为醇或胺的糖基化，产物是 *O*-糖苷和 *N*-糖苷。



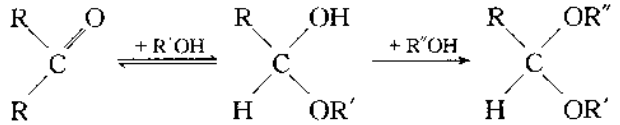
在糖苷中的 R 基团是糖苷配基。

母体单糖中，由于异头体碳仍是手性中心，其可以是 α 或 β 构象。

问题：糖苷环与单糖环有哪些不同？

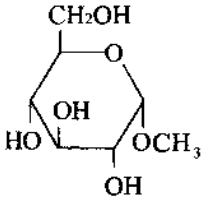
糖苷环不能打开生成直链结构，且糖苷无还原性。

以化学观点看，糖苷是缩醛（详见 2.5 节）

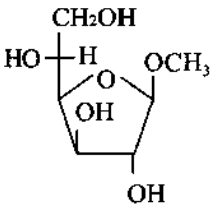


醛（开链单糖）　半缩醛（环形式）　缩醛（糖苷）

糖苷是通称。葡萄糖、果糖和核糖的糖苷分别是葡萄糖苷、果糖苷、核糖苷等，即词尾加苷表示。与母体单糖一样，糖苷具有五元环或六元环形式的呋喃糖苷或吡喃糖苷。



α-D-甲基吡喃葡萄糖苷



β-D-甲基吡喃葡萄糖苷

问题：当新配的 α-D-甲基吡喃葡萄糖苷溶液在放置过程中其旋光活性会发生什么变化？

保持不变。由于糖苷环不能打开，这种结构不表现变旋现象。

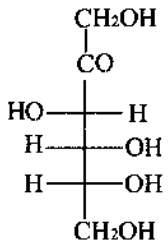
例 2.22

β-D-甲基吡喃果糖苷的结构：

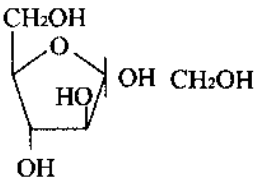
1 写出 D-果糖的结构。

2 转变成五元环的哈沃斯环结构（以例 2.10 为例）。

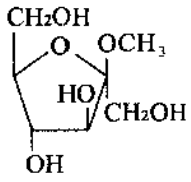
3 取 β 异头体，并用甲氧基将异头体羟基取代。



(1)



(2)



(3)

β-D-甲基呋喃果糖苷

糖苷键广泛存在于生物化合物中，并且由糖苷键连接两个单糖的糖苷（即糖苷配基是一个糖）具有特别重要的意义，这样的化合物称为二糖。第二个单糖上的异头体羟基能与第三个单糖的羟基糖苷化而生成三糖等。多糖是大量的单糖通过糖苷键联接形成的聚合物。

问题：什么是寡糖？

寡糖是由少量不确定数目的单糖通过糖苷键连成的化合物。

问题：为什么在寡糖和多糖中单糖单位叫残基？

每一个糖苷键都是通过缩合反应生成的。反应过程中生成一个水分子。除末端的单糖外，所有的单糖都失去一个水分子，因此叫残基是恰当的。

残基的名称是通过在糖的名称后加“残基”（简称“基”）而得到的。因此，三个葡萄糖生成的三糖叫葡萄糖基葡萄糖基葡萄糖。为简化寡糖和多糖的书写形式，引入了残基名称的

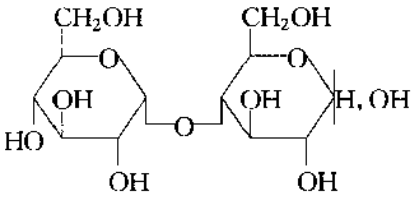
简写方法。例如：Glc（葡萄糖基），Gal（半乳糖基）Fru（果糖基）GlcN（葡氨糖基）GlcNAc（*N*-乙酰胺基葡萄糖基）GlcA（葡萄糖醛酸基）NeuNAc（*N*-乙酰神经氨糖基）。

聚糖是多糖的另一种叫法。如葡聚糖、木聚糖、葡甘聚糖分别指由葡萄糖残基、木糖残基、葡萄糖和甘露糖残基组成的聚合物。

在理解寡糖和多糖结构方面的最大问题是有关糖苷键的写法。

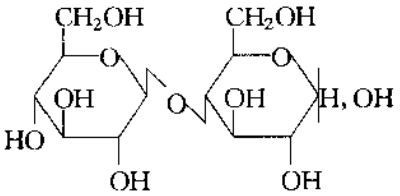
例 2.23

下面表示出由葡萄糖组成的不同二糖的结构



麦芽糖

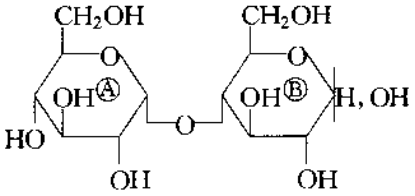
α-Glc-(1→4)-Glc

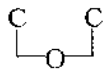


纤维二糖

β-Glc-(1→4)-Glc

由于下面即将提到的原因，连接两个葡萄糖分子的糖苷键写成以上形式（假设两个单糖分别为A和B），通过A的异头体羟基与B的C-4位羟基糖苷化生成二糖。



这样的结构以下两方面是不清楚的。其一，它没有表示出A中C-1的构型，即糖苷键是α型还是β型；其二，它没有表示出B中C-4的构型，因此不能确定B的种类。B可以是葡萄糖（葡糖苷O在B环下）或者半乳糖（糖苷O在B环上）。因此麦芽糖和纤维二糖写成上面的形式，明确地表示出了：①相应于糖苷基，糖配键是α型还是β型；②另一个是什么糖。将糖苷键写成  和 形式是一种图示方法，它清楚地表示出手性碳的构型，而实际上键并不弯曲。

问题：麦芽糖和纤维二糖的系统名称是什么？

麦芽糖是α-D-葡萄糖基-(1→4)-D-葡萄糖，更明确的为α-D-吡喃葡萄糖基-(1→4)-D-吡喃葡萄糖。纤维二糖是β-D-葡萄糖基-(1→4)-D-葡萄糖。

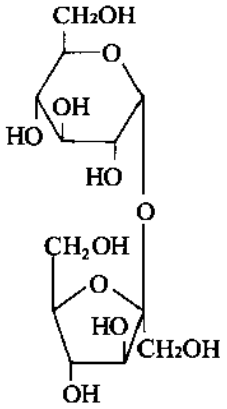
在例2.23中给出的麦芽糖结构中没有表示出右面葡萄糖单元异头体碳的构型，这种结构表示的是麦芽糖在溶液中的状态——α和β异头体的混合物。晶态麦芽糖的异头体羟基为α型，可描述为：α-D-葡萄糖基-(1→4)-2-D-葡萄糖。

问题：麦芽糖是还原性糖吗？

麦芽糖是还原性糖。虽然它是一个糖苷，但第二个葡萄糖单元具有一个异头体碳原子。而且环能够打开变成醛基。同样的原因，麦芽糖溶液也具有变旋现象。

问题：为什么另一种二糖，蔗糖没有还原性？

蔗糖是由α-D-葡萄糖的异头体羟基与β-D-果糖（例2.22）的异头体羟基缩合而成的二糖。两者分别是α-葡萄糖苷和β-果糖苷。没有一个单元具有异头体羟基，没有一个环能够打开生成醛基。



问题：蔗糖的系统名称是什么？

α-D-葡萄糖基-(1→2)-β-D-果糖苷[α-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-β-D-吡喃果糖苷]或β-D-果糖基-(2→1)-α-D-葡萄糖苷[β-D-吡喃果糖基-(2→1)-α-D-吡喃葡萄糖苷]。它们可分别简写为：α-Glc-(1→2)-β-Fru和β-Fru-(2→1)-α-Glc。

2.9 多糖

作为结构材料的成分或能量的贮存形式是多糖的主要功能。

例2.24

淀粉和糖原是葡萄糖的聚合物（葡聚糖），作为糖的贮存分子，分别存在于植物和动物体内。淀粉以两种形式存在，分别为直链淀粉［即由α(1→4)糖苷键连接α-D-葡萄糖而成的线形聚合物］和支链淀粉［即由于α(1→6)糖苷键的存在使直链产生支化］。糖原（详见第11章）也是一种支化的葡聚糖，但支化程度大于支链淀粉。虽然直链淀粉的线形长链倾向于采用螺旋构象，但其相邻的残基之间也可以无规则的排列。当有碘存在时，葡萄糖残基与碘原子之间的相互作用使螺旋构象稳定化。碘原子被包于螺旋中后生成的结构具有亮蓝色。

例2.25

纤维素是植物细胞壁的主要材料，也是线形葡萄糖聚合物，但其是通过β（1→4）键连接而成的。

问题：为什么纤维素不溶于水，而与其结构非常相似的淀粉可溶于水？

淀粉和纤维素的结构间看似很小的不同却使得纤维素的直链以边靠边反平行延伸的构象方式堆积，并通过氢键作用而使其稳定化，从而得到具有高力学强度的不溶产物。

β(1→4)键合对水解作用特别稳定。哺乳动物不能消化纤维素。有些昆虫（特别使白蚁和食木蟑螂）、原生动物和真菌具有能够水解β(1→4)键的纤维素酶。反刍动物如羊和牛因其消化系统中存在共生的原生动物而使其能够消化纤维素。

除纤维素外，植物体中还含有胶质和半纤维素。胶质是由阿拉伯糖、半乳糖和半乳糖醛酸组成的聚合物。半纤维素不是由纤维素衍生得到的，它是D-木糖、D-甘露糖或D-半乳

糖的聚合物。这些化合物形成了基质部分，而纤维是由基质和基质内含的纤维素组成的。

许多真菌的细胞壁，昆虫、节肢动物及软体动物的外骨骼主要是由壳聚糖组成的，它是一种由 *N*-乙酰-β-D-葡萄糖胺以β(1→4)糖苷键连接而成的聚合物。

哺乳动物的结缔组织中富含被称为糖胺聚糖或黏多糖的多糖。属糖胺聚糖类的多糖有很多种。硫酸软骨素是由葡萄糖醛酸和 *N*-乙酰半乳糖胺通过 α (1→3) 键连成的二糖重复构成的聚合物，并且大部分半乳糖胺中的C-6羟基被硫酸酯化了。透明质酸存在于肘关节和膝关节的滑液中，是由葡萄糖醛酸和 *N*-乙酰葡萄糖胺组成的二糖重复构成的聚合物。

问题：在糖胺聚糖中的羧基和硫酸酯基有什么生理功能？

在中性pH值环境下，在这些基团上的负电荷所产生的静电排斥力可增大分子的尺寸。溶液中大部分的空间被这种扩展了的分子所占据，使溶液具有高黏度，并辅助透明质酸作为一种关节润滑液。

问题解答

D-葡萄糖的结构

2.1 溶液中D-葡萄糖主要以α和β异头体形式的D-吡喃葡萄糖存在，两者都是非还原性的。为什么D-葡萄糖溶液是强还原剂？

答：

因为溶液中存在一些具有还原性的开链葡萄糖。由于反应，在糖的开链结构和非还原性的环状形式之间的平衡被打破，导致更多的开链形式生成。最终，所有的葡萄糖将通过开链形式而发生反应。

2.2 平衡时溶液中以β异头体存在的D-葡萄糖占多少比例？

答：

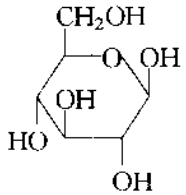
据定义，1ml溶液中1g β-D-葡萄糖在1dm长的旋光管中的旋光度是 +19°。同样情况下，1g α-D-葡萄糖的旋光度是 +112°（见2.5节）。平衡时，假设β-D-葡萄糖有 *b*g/ml，则 α-D-葡萄糖为(1 − *b*)g/ml，平衡时的旋光度(+52°，例2.11)是 *b*g β-D-葡萄糖和(1 − *b*)g α-D-葡萄糖两者的贡献。即：$b \times (+19°) + (1-b) \times (+112°) = +52°$，从而可得 $b = 0.64$g。因此，平衡时葡萄糖中含64%的β异头体。(这个答案假设在平衡混合物中开链结构葡萄糖的贡献可忽略不计，这个假设得到了平衡时溶液中旋光光谱和NMR的证明和支持。)

葡萄糖的构象

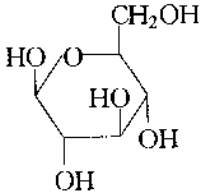
2.3 写出β-L-吡喃葡萄糖的哈沃斯结构。

答：

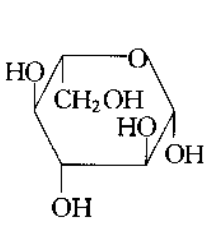
据定义，其为β-D-吡喃葡萄糖的镜像。设想将镜子放在β-D-吡喃葡萄糖的 (1) 左面 (2) 右面 (3) 上方 (4) 下方 (5) 前面 (6) 后面，分别将其结构画出。下面给出了三种镜像。



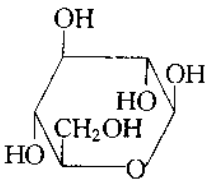
β-D-吡喃葡萄糖



(2)



(4)



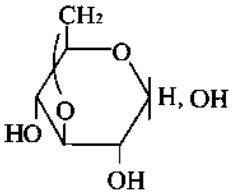
(5)

所有6个镜像都代表同样的结构，并且可通过旋转任何镜像上适当的轴而得到。例如，通过转动纸面内的水平轴将（4）向前转180°将得出（5）。

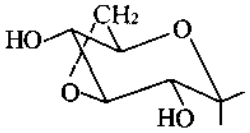
2.4　3，6-脱水-D-葡萄糖的优势构象是什么？

答：

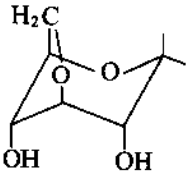
3，6-脱水-D-葡萄糖（1）是在葡萄糖分子C-3和C-6之间的羟基脱去一个水分子而得的产物。D-葡萄糖的优势构象是C1，但（1）不可能采取C1构象，这是因为（如下图（2）中所示）C-3上的O原子距C-6太远，则它们之间无法形成化学键所致。因此，1C是其可能的构象（如图中（3）所示）。但由于存在大量的直立羟基，且在C-3和C-6间存在由C-3、C-4、C-5、C-6和O原子形成的环张力，使得这种结构不稳定。3，6-脱水-D-葡萄糖的优势构象是（4），其具有两个相结合的平面五元环。



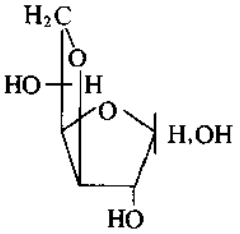
(1)



(2)



(3)



(4)

葡萄糖以外的单糖

2.5　D-甘露糖和D-半乳糖是差向异构体吗？

答：

不是。它们在两个碳原子上的构型不同。

2.6　图2-2表示β-D-核糖溶于水后的变旋现象，如何解释这条曲线？

答：

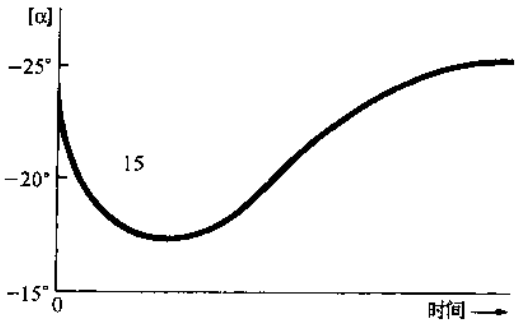


图2-2　β-D-核糖溶于水中的变旋现象

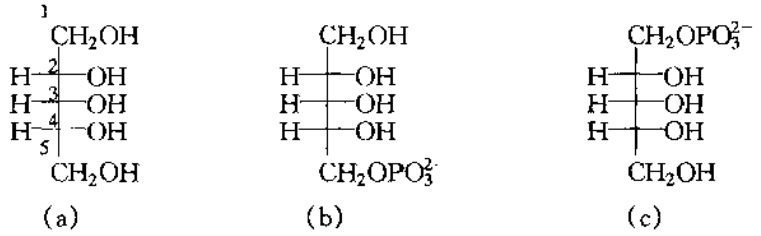
晶态β-D-核糖是β-D-吡喃核糖（见2.7节）。当核糖溶子水后，吡喃糖环打开，生

成的开链形式又将环化生成吡喃糖环和呋喃糖环形式。在开链形式的糖中，由于C-4上的羟基接近C-1的机会远大于C-5上的羟基，因此其形成吡喃环更快一些。然而吡喃糖环更稳定，因为其较大而空间斥力较小。因此在图2-2中，初始旋光性的变化是由于形成了相对高浓度的呋喃糖环形式所致。后期旋光性的变化反映出重新生成了吡喃糖形式且浓度逐渐生高。

2.7 请表示出1-磷酸-L-核糖醇酯与5-磷酸-D-核糖醇酯是相同的。

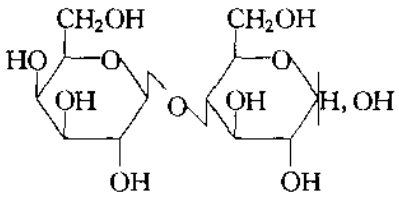
答：

在核糖醇中所有的碳原子都处于同样的氧化态，碳链可以从任何一端编号。若按（a）所示编号，同时假设C-1是从醛基衍生而来，那么这个化合物将与L-核糖相关（将(a)结构上下颠倒），称为L-核糖醇。1-磷酸-L-核糖醇酯可用（c）表示，很明显，(c)与（b）中所示的磷酸酯相同。



糖苷键

2.8 下图所示二糖为乳糖，是存在于哺乳动物奶中的碳水化合物。请写出（a）全称及（b）简称。



乳糖

答：

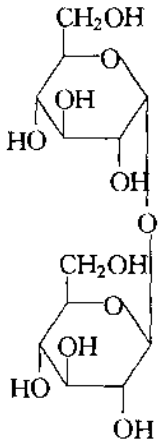
(a) β-吡喃半乳糖基-(1→4)-吡喃葡萄糖

(b) β-Gal-(1→4)-Glc

2.9 请给出仅含葡萄糖的非还原性的二糖的结构。

答：

由于二糖没有还原性，因此两个葡萄糖分子中的异头体碳必须通过糖苷键相连接在一起。此种产物称作海藻糖。它以三种异头体形式存在，即葡萄糖分子以α，α；β，β；α，β（如图）形式相互连接在一起。α，β-海藻糖全称是α-D-吡喃葡萄糖基-(1→1)-β-D-吡喃葡萄糖。



多糖

2.10 壳聚糖的部分酸水解将生成什么产物？

答：

β(1→4)键合相对较难水解。因此主要在*N*-乙酰基位置上发生水解，生成聚（α-D-葡萄糖胺）和乙酸。这种材料叫聚葡萄糖胺。

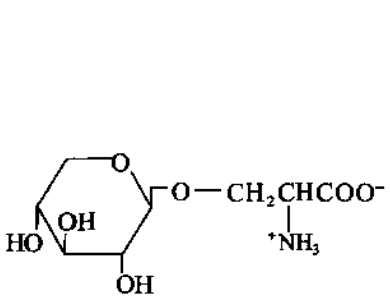
2.11 如何确定直链淀粉样品的聚合度（即每个链上葡萄糖残基的平均数量）?

答：

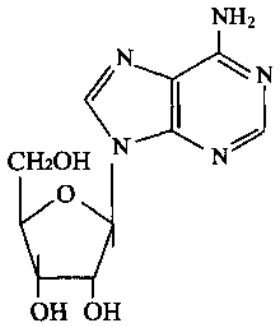
直链淀粉的每个多糖链中只有一个还原性基团，即聚合物最后一个残基的C－1处的基团。准确灵敏地测定样品中还原性基团的浓度可提供聚合物链数目的估计值。分析葡萄糖的总浓度，从总葡萄糖浓度与还原性基团浓度的比值可估计聚合度。

补充问题

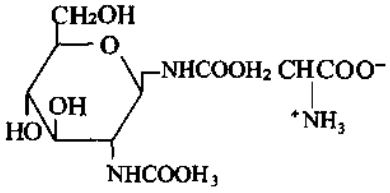
2.12 通过分类和名称确认下列糖苷中的单糖，给出每个糖苷键的构型。



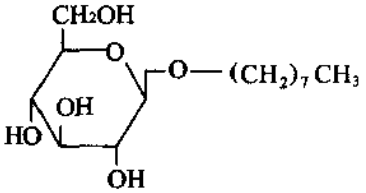
(a)



(b)



(c)



(d)

2.13 下列哪个是还原性糖?

(a) 半乳糖	(b) β-甲基半乳糖苷	(c) 麦芽糖
(d) 甘露糖	(e) 木糖	(f) 果糖
(g) 鼠李糖	(h) 核糖	(i) 葡萄糖胺
(j) 葡萄糖醛酸	(k) 葡萄糖醇	

2.14 (a) 画出吡喃糖形式的所有β-D-庚醛糖的结构。(b) 画出异头体、对映体、差向异构体的结构。

2.15 一个糖（$C_5H_{10}O_5$）经还原醛基处理后得到的产物无光学活性，假设此糖为D型，那么此糖的两种可能结构是什么?

2.16 放置数小时后，D-半乳糖水溶液的旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ 为 +80.2°。纯α-D-半乳糖和β-D-半乳糖的旋光率分别是 +150.7° 和 +52.8°，计算平衡混合物中α-和β-D-半乳糖的比例。

2.17 水中麦芽糖的旋光率是 +138°，如果用10cm长的旋光管测得的麦芽糖溶液的旋光度为 +23°，则其浓度是多少?

2.18 一种叫蔗糖酶的酶催化蔗糖水解成等摩尔的D-葡萄糖和D-果糖混合物。在水解过程中，溶液的旋光性由（+）变为（-），你能从这个现象中得出什么结论?

2.19 野尻霉素（5-氨基-5-脱氧-D-葡萄糖）是一种用来研究糖蛋白的生物合成的抗菌素。写出它的开链和吡喃糖环结构。

2.20 β-D-吡喃葡萄糖有两种可能的椅式构象异构体，它有多少可能的船式构象异构体?

2.21 请表示出在β-L-吡喃葡萄糖中，所有在环中碳上的取代基都是平伏键的结构。

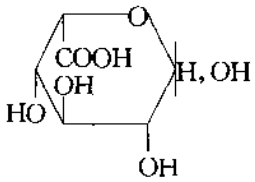
2.22 写出一种存在于昆虫淋巴中的碳水化合物——海藻糖（见问题2.9）的优势构象。

2.23　赤藓醇是 D-赤藓糖的还原产物，为什么在它的名称前省略了前缀 D-?

2.24　D-半乳糖的还原产物半乳糖醇是当人患了半乳糖血症时在体内积累的一种有毒的副产物，写出它的结构。

2.25　写出 (a) D-葡萄糖酸和 (b) D-葡萄糖醛酸的开链结构。

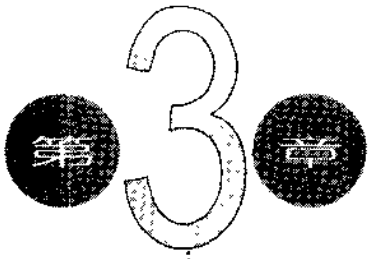
2.26　L-艾杜糖醛酸是在结缔组织中发现的一些多糖的部分结构，这个糖是如何通过一步反应由 D-葡萄糖醛酸生成的?



2.27　写出例 2.20 中命名的糖衍生物的费歇尔投影式。

2.28　甲基戊糖的名称有时用来描述 L-岩藻糖和 L-鼠李糖，这个名称对吗？请解释你的答案。

2.29　α-甲基-D-吡喃葡萄糖苷和 β-甲基-D-吡喃葡萄糖苷是异头体，异构体，还是构象异构体?



第3章 氨基酸和肽

3.1 氨基酸

蛋白质中的氨基酸

所有蛋白质均是由氨基酸所组成的长链分子，通过一个氨基酸的氨基与其相邻的氨基酸的羧基所形成的肽链相连在一起。蛋白质中的氨基酸都是α-氨基酸；也就是说，氨基和羧基均与同一个碳原子（α-碳原子，见图3-1）相连。α-碳原子是一个潜在的手性中心，并且除了R-基（或称为侧链）为H原子外，氨基酸均具有光学活性。蛋白质中的氨基酸都是L-构型，如图3-1所示。

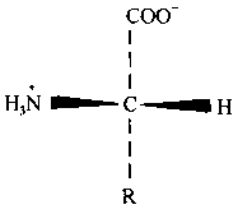
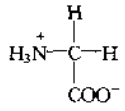
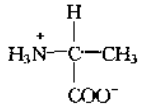
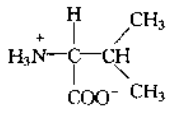
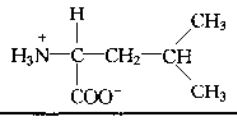


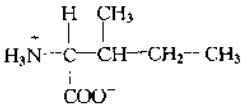
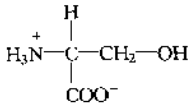
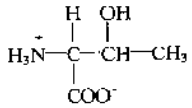
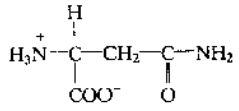
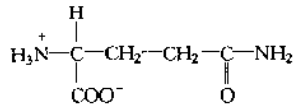
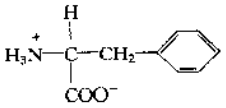
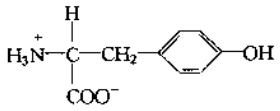
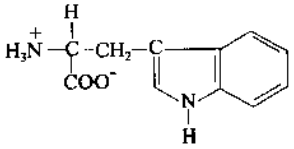
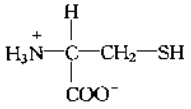
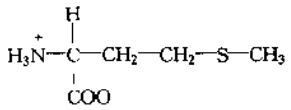
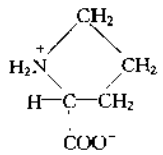
图3-1 L-构型的α-氨基酸的结构通式；R基代表20余种不同的化学基团中的一种

蛋白质是由20种不同的氨基酸所组成，这些氨基酸列于表3.1，表中还列出了每种氨基酸的两种常用简写符号。尽管3个字母的简写便于易记忆，但在写长序列氨基酸组成时单字母符号则更常用。在许多蛋白质中，一些氨基酸在蛋白质合成后可被修饰；例如在胶原中，每几个脯氨酸残基中就会有一个被加上羟基而形成羟脯氨酸残基。除脯氨酸外，组成蛋白质的氨基酸均可由图3-1所示的方式来代表。

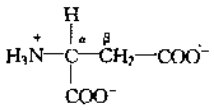
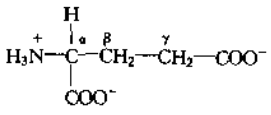
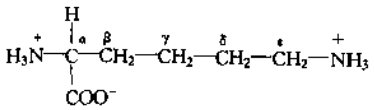
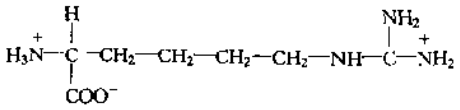
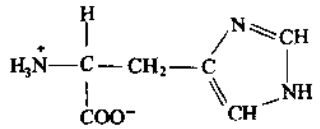
表3.1 蛋白质中的氨基酸，根据侧链的化学性质分类

结构	名称	简写符号	
1. 中性氨基酸			
(a) 非极性脂肪族			
	甘氨酸	Gly	G
	丙氨酸	Ala	A
	缬氨酸	Val	V
	亮氨酸	Leu	L

续表

结　构	名称	简写符号	
	异亮氨酸	Ile	I
(b) 极性脂肪族			
	丝氨酸	Ser	S
	苏氨酸	Thr	T
	天冬酰胺	Asn	N
	谷氨酰胺	Gln	Q
(c) 芳香族氨基酸			
	苯丙氨酸	Phe	F
	酪氨酸	Tyr	Y
	色氨酸	Trp	W
(d) 含硫氨基酸			
	半胱氨酸	Cys	C
	甲硫氨酸	Met	M
(e) 亚氨基酸			
	脯氨酸	Pro	P

续表

结　构	名称	简写符号	
2. 酸性氨基酸			
	天冬氨酸	Asp	D
	谷氨酸	Glu	E
3. 碱性氨基酸			
	赖氨酸	Lys	K
	精氨酸	Arg	R
	组氨酸	His	H

注：结构式中的希腊字母是指某些氨基酸中碳链的命名。与羧基相连的碳原子标为 α。

氨基酸的侧链不属于任一天然系列代合物，因此，没有一种容易的方法来了解它们的结构。根据侧链的极性或非极性，芳香族或脂肪族以及酸性或碱性等性质来将它们分类是非常有用的，但这些分类方法并不相互排斥。例如酪氨酸，既可属芳香族氨基酸又可属极性氨基酸，虽然其芳香族化合物上的羟基所产生的极性是比较弱的。

芳香族氨基酸在紫外区有强的光吸收。利用这一特性可测定溶液中这些氨基酸的浓度。比尔-朗伯定律显示在特定波长下，溶液中物质的光吸收与其浓度 C（以 $mmol^{-1}$ 为单位）和溶液中光径长（以 cm 为单位）成正比：

$$A = \varepsilon Cl \tag{3.1}$$

其中 A 代表溶液的吸光值 ε 是摩尔吸光系数。吸光值的定义是入射光强度（I_0）与出射光强度（I）比值的对数：

$$A = \lg \frac{I_o}{I} \tag{3.2}$$

例 3.1

假定：酪氨酸在 275nm 时，水溶液中的摩尔吸光系数是 $1420 Lmol^{-1}cm^{-1}$，则光径 1cm 时吸光值为 0.71，那么酪氨酸在溶液中的浓度是多少？

根据比尔-朗伯定律：

$$C = A/\varepsilon \cdot l = 0.71/(1420 \times 1.0) = 5 \times 10^{-4} molL^{-1}$$

非蛋白质氨基酸

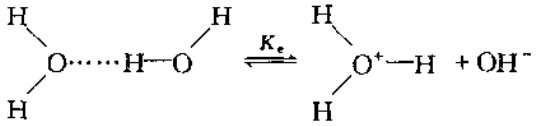
代谢中的许多氨基酸并不组成蛋白质；例如 β-丙氨酸，$^{-}OOC—CN_2—CN_2—NH_3^{+}$，是合成 β 族维生素泛酸的一个中间体，但在蛋白质中却未发现其存在。尽管绝大多数天然存在的氨基酸为 L-构型，但在某些抗生素以及细菌的细胞壁中发现了一些 D-型氨基酸。

3.2 氨基酸的酸碱性质

氨基酸是两性化合物；即它们既含有酸性基团也含有碱性基团。因此，根据溶液性质的不同，它们可以带净电荷。带电荷的分子可以影响它和其他分子间的相互作用；这一性质可被用于分离纯化氨基酸和蛋白质。因此清楚地了解那些影响氨基酸所带电荷的因素是非常重要的。

水的离子化

水是主要的生物溶剂，所溶分子的酸碱性与其水溶性密切相关。水可以微弱电离成一个质子和一个氢氧根离子。在这一过程中，质子与相邻水分子以氢键（见第4章）相连形成一个水合离子（H_3O^+）：



纯水在25℃时，在任一时刻都存在 1.0×10^{-7}molL^{-1}的 H_3O^+和同样浓度的 OH^-离子。需要强调的是，由于蛋白质与水分子有如此高的亲和力，使得蛋白质在水中几乎不可能是"裸露"的。除了 H_3O^+外可能还存在其他的水化物，但由于水分子间有大量的氢键连接，故通过实验来鉴定这些水化物是困难的，并且作为一个简化形式，水合质子可写成 H+。

水的溶解是一个迅速平衡过程，可用以下的公式表示：

$$K_e = \frac{a_{H_3O^+} \times a_{OH^-}}{(a_{H_2O})^2} \tag{3.3}$$

因此，对于稀溶液，水的活性系数 a（见第10章）是一个常数，且非常接近于1.0，并且溶解活性可用 H_3O^+与 OH^-的浓度来代表，因此可定义一个实用常数 K_w，表示水的离子产物。

$$K_w = [H_3O^+] \cdot [OH^-] \tag{3.4}$$

更为常见的形式是 $K_w = [H^+] \cdot [OH^-]$，其中忽略了质子的水合而写成简化形式。注意方括号代表离子的浓度，单位是 mol L^{-1}。

纯水在25℃时，$K_w = 10^{-14}$。因此，在纯水中 $[H^+] = [OH^-]$，

$$[H^+] = \sqrt{10^{-14}} = 10^{-7}\text{mol L}^{-1}$$

由于 K_w 为常数，在酸性溶液中，$[H^+]$ 浓度较高，$[OH^-]$ 则相应降低。K_w 值是温度依赖性的；例如，37℃时 $K_w = 2.4\times10^{-14}$。

例 3.2

25℃时，$[H^+] = 0.1\text{mol L}^{-1}$，计算水溶液中 $[OH^-]$。

由于 $[H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-14}$

$$[OH^-] = \frac{10^{-14}}{10^{-1}} = 10^{-13}\text{mol L}^{-1}$$

酸性与 pH 值

荷兰化学家 S. P. L. Sørensen 将 pH 值（氢电势）定义为

$$pH = -\lg [H^+] \tag{3.5}$$

中性溶液被定义为当 $[H^+] = [OH^-]$ 时的溶液，且纯水在25℃时，

$$pH = -\lg [10^{-7}] = 7.0 \tag{3.6}$$

注意通常在实验室中使用的蒸馏水并不是绝对的纯水。由于其中溶解的痕量 CO_2 所产

生的碳酸可使氢离子浓度达到 10^{-5}mol L^{-1}左右，pH 值相应变为 5 左右。

例 3.3

计算浓度为 4×10^{-4}mol L^{-1}盐酸（HCl）溶液的 pH。

在如此低浓度下，可认为 HCl 完全解离为 H^+ 和 Cl^-。因此

$$[H^+] = 4\times10^{-4}\text{mol L}^{-1}$$

且

$$pH = -\lg[4\times10^{-4}] = 3.40$$

注意酸性溶液（H^+浓度高）pH 值低而碱性溶液（OH^-浓度高而 H^+浓度低）pH 值高。$[H^+]$ 增加 10 倍，则 pH 值相应减少 1.0。

弱酸和弱碱

酸

酸是指能提供一个质子给其他化合物的一种化合物（所谓 Brϕnsted 定义）。化合物 CH_3COOH 就是一种酸，乙酸。然而，乙酸溶于水时并不是所有的羟基均可溶解，故乙酸是一种弱酸。任何 HA 型弱酸在水中的溶解反应是：

$$HA + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$$

因此乙酸的溶解反应是：

$$CH_3COOH + H_2O \rightleftharpoons CH_3COO^- + H_3O^+$$

H^+供体（酸）　H^+受体（碱）　共轭碱　　共轭酸

给出质子和接受质子是一个双向过程。形成的 H_3O^+ 离子能提供一个质子给乙酸根离子而形成乙酸。即可认为 H_3O^+ 离子是一种酸而乙酸根离子是一种碱。乙酸根被称为乙酸的共轭碱。

结合与溶解这两个过程达到平衡。结果溶液中 H_3O^+ 浓度高于纯水中 H_3O^+ 浓度；即该溶液 pH 值低于 7.0。

酸溶常数，K_a 是一种衡量酸性强度的指标：

$$K_a = \frac{a_{H_3O^+}\cdot a_{A^-}}{a_{HA}\cdot a_{H_2O}} \tag{3.7}$$

对于乙酸来说，K_a 则为：

$$K_a = \frac{a_{H_3O^+}\cdot a_{CH_3COO^-}}{a_{CH_3COOH}\cdot a_{H_2O}}$$

其中 a 代表化学物质的热力学活性（见第 10 章）。

在稀溶液中，水浓度非常接近于纯水，且纯水活度被定为 1.0，进而在稀溶液中，溶液活度可近似等于溶液浓度；因此可将实际酸溶解常数表示为：

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \tag{3.8}$$

对于乙酸来说，则为：

$$K_a = \frac{[H^+][CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$

K_a 值越大，酸解离出质子的趋势越大，因此酸性越强。

与定义 pH 值相似，可定义：

$$pK_a = -\lg K_a \tag{3.9}$$

因此，化合物的 pK_a 值越低，则 K_a 值越高，酸性也越强。

例 3.4

下列哪种酸的酸性更强：硼酸，$pK_a = 9.0$，还是乙酸，$pK_a = 4.6$?

对于硼酸，$K_a=10^{-9}$，而乙酸 $K_a=10^{-4.6}=2.5\times10^{-5}$，因为乙酸的 K_a 值较大，故酸性较强。

碱

碱是能从酸中接受质子的化合物。甲胺，$CH_3—NH_2$ 溶于水时，能从水分子获得一个质子，因此可增加 OH^- 浓度提高 pH 值。

$$CH_3\text{-}NH_2 + H_2O \rightleftharpoons CH_3\text{-}NH_3^+ + OH^-$$

碱　　酸　　共轭酸　　共轭碱

如同乙酸一样，随着 OH^- 浓度的增加，逆反应变得更加显著并且这一过程最终达到平衡。

碱性常数 K_b 可表示为：

$$K_b = \frac{[CH_3\text{-}NH_3^+][OH^-]}{[CH_3\text{-}NH_2]} \tag{3.10}$$

然而，应用这一常数可能会产生混乱，因为需要记录两种不同类型的常数，K_a 和 K_b。由于化学平衡是一个双向的过程，若认为碱的性质可由其共轭酸来代表则是更为确切且更为方便的。共轭酸可为水分子提供质子：

$$CH_3\text{-}NH_3^+ + H_2O \rightleftharpoons CH_3\text{-}NH_2 + H_3O^+$$

并且

$$K_a = \frac{[CH_3\text{-}NH_2][H_3O^+]}{[CH_3\text{-}NH_3^+]} \tag{3.11}$$

因此，K_a 和 K_b 的关系如下：

$$K_a \cdot K_b = \frac{[CH_3\text{-}NH_2][H_3O^+]}{[CH_3\text{-}NH_3^+]} \cdot \frac{[CH_3\text{-}NH_3^+][OH^-]}{[CH_3\text{-}NH_2]} = [H_3O^+][OH^-]$$

即

$$K_a \cdot K_b = K_w \tag{3.12}$$

换句话说，若已知共轭酸的 K_a 值，则可计算碱的 K_b 值。因此碱的特性是其共轭酸 K_a 值较低。

缓冲体系

加入小量酸或碱时，酸及其共轭碱所组成的混合物可对抗溶液 pH 值的改变，这样的酸碱混合物称为缓冲体系。

再次以乙酸的解离为例：

$$CH_3COOH + H_2O \rightleftharpoons CH_3COO^- + H_3O^+$$

加入酸则会使 H_3O^+ 与 CH_3COO^- 再结合形成乙酸，可对抗的 H_3O^+ 集结。反之，加入 NaOH 则使乙酸解离为乙酸根，降低了 H_3O^+ 浓度，采用平衡反应式（3.8）双侧取对数值的方法，可将该性质定量表示为

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$$\lg K_a = \lg[H^+] + \lg[A^-] - \lg[HA]$$

等式两侧均乘以 -1，可得：

$$-\lg K_a = -\lg[H^+] - \lg[A^-] + \lg[HA]$$

由公式（3.9）可知，$-\lg K_a = pK_a$，由公式（3.5）可知 $-\lg[H^+] = pH$。

通过替换，可得

$$pK_a = pH + \lg\frac{[HA]}{[A^-]} = pH + \lg\frac{[酸]}{[共轭碱]} \tag{3.13a}$$

或

$$pH = pK_a + \lg \frac{[碱]}{[共轭酸]} \tag{3.13b}$$

此为 Henderson-Hasselbalch 公式的两种形式，利用这一公式可计算特定 pH 值的缓冲液组成。注意，如果 [HA] = [A^-]，则 pH = pK_a。

例 3.5

(a) 计算含有 0.1mol L^{-1}乙酸和 0.1mol L^{-1}乙酸钠的缓冲液的 pH 值。乙酸的 pK_a 为 4.7。(b) 加入 0.05mol L^{-1}NaOH 后 pH 值为多少？(c) 将这一 pH 值与单纯 0.05mol L^{-1} NaOH 溶液的 pH 值做比较。

解：(a) 由 Henderson-Hasselbalch 公式 (3.13b) 可得：

$$pH = pK_a + \lg \frac{[碱]}{[酸]}$$

因此：

$$pH = 4.7 + \lg \frac{0.1}{0.1} = 4.7 + 0 = 4.7$$

(b) 加入 0.05mol/LNaOH 后，未溶乙酸浓度降到 0.05mol/L，而乙酸根浓度升高到 0.15mol/L。因此，

$$pH = 4.7 + \lg \frac{0.15}{0.05} = 4.7 + \lg 3 = 4.7 + 0.48 = 5.18$$

(c) 0.05mol L^{-1}NaOH 的 pH 值即溶液中 $-\lg [H^+]$。若假设 NaOH 在水中完全解离，则 [OH^-] 值为 0.05mol L^{-1}。水的离子产物值已知为 10^{-14}mol L^{-1}，则

$$[H^+] = 10^{-14}/0.05$$

且

$$pH = 12.7$$

与该值相比，加入等量碱后，缓冲液的 pH 值只发生轻微改变。

简单氨基酸的酸碱性质

许多生物分子都包含不止一种可解离基团，一种基团的解离可极大地影响其他基团的解离。氨基酸，既含有羧基又含有氨基，可用来说明这种现象。在水溶液中，羧基易于解离出质子，而氨基则倾向于结合质子。因此这两个反应可大大促进反应的完成，而无 H_3O^+ 或 OH^-的堆积。其中一个重要的结果是在近中性 PH 值溶液中，氨基酸既带负电荷也带正电荷，称之为兼性化合物。

氨基酸的滴定

测定氨基酸兼性（两性）性质的方法之一是进行滴定研究。

例如，假定对甘氨酸的盐酸盐溶液来进行滴定，其中两个基团均处于酸性形式。加入 NaOH 可增加溶液的 pH 值，同时解离的质子可与加入的 OH^- 反应生成水而促进其进一步解离，如图 3－2 所示。

图 3－2 中的曲线有两个明显的拐点，其中一个代表甘氨酸盐酸中的两个酸性基团。在 A 点上，两个基团均为酸性（质子化）形式：$HOOC—CH_2—NH_3^+$ 且分子所带电荷数为 +1，在加入 10mmol NaOH 后，（C 点，pH 值接近 6.0）一个基团几乎完全去质子化，且分子净电荷 0。继续加入 10mmol NaOH 后，另外一个基团也去质子化（E 点），分子形式为 $^-OOC—CH_2—NH_2$，且电荷数为 −1。

在 B 点和 D 点附近，加入一定量的 NaOH 后，pH 值变化最小；即溶液具有缓冲作用。在 B 点，pH 为 2.3，第一个基团有一半已被滴定生成其共轭碱，而另一半仍为酸性形式；即 [酸] = [共轭碱]。在这一点上，由公式 (3.13)，pK_a = pH，或就这一基团而言，pK_a = 2.3。被滴定的第一个基团必须有相对较强的酸性，且这一基团是羧基。同理可知第二个

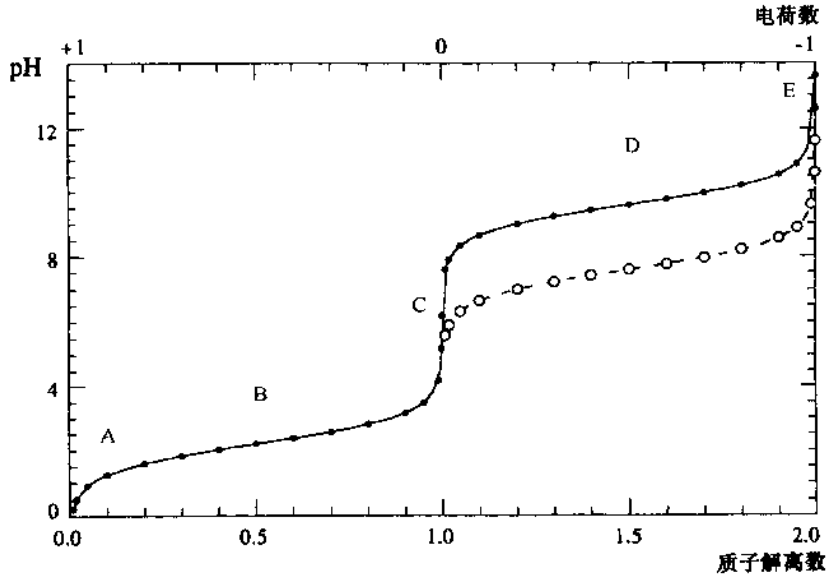


图 3-2 用 NaOH 溶液滴定 10mmol 甘氨酸盐酸溶液。不连续的曲线代表在有甲醛存在时的滴定过程

基团-氨基的 pK_a 为 9.6。

例 3.6

当滴定到 pH 为 6.3 时，第一基团（羧基）的解离比例是多少？根据 Henderson-Hasselbalch 公式（3.13b）：

$$pH = pK_a + \lg \frac{[碱]}{[酸]}$$

pH 为 6.3 时，羧基的 pK_a 为 2.3：

$$\lg \frac{[碱]}{[酸]} = 6.3 - 2.3 = 4.0$$

因此，[碱] $=10^4 \times$ [酸]。这一结果提示在 pH 为 6.3 时，10 000 个羧基中只有一个羧基是质子化的（0.01%）。

分子不带净电荷时的 pH 值称为等电点。甘氨酸的等电点为 6.0。当然，在 pH 为 6 的甘氨酸溶液中，任何时候都有一些分子以 $COOH—CH_2—NH_3^+$ 形式存在，而有等量分子以 $COO^-—CH_2—NH_2$ 形式存在，而 $COOH—CH_2—NH_2$ 形式存在的分子较少。由于等电点附近滴定曲线的对称性给定某一 pK_a 值后，就可计算等电点的 pH 值。

等电点时：

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} \tag{3.14}$$

甲醛滴定

在滴定氨基酸时，可利用化学修饰作用来改变 pK_a 值的分配。例如，加入甲醛后滴定，在图 3-2 中可发现 pK_{a1}指羧基，pK_{a2}指氨基。

例 3.7

甲醛与不带电的氨基所进行如下可逆反应：

$$R—NH_2 + 2HCHO \rightleftharpoons R—N\begin{matrix}CH_2—OH\\ \\CH_2—OH\end{matrix}$$

因此在甲醛溶液中氨基的 pK_a 值发生了改变，而羧基保持原状未受影响。在甲醛溶液中发现氨基酸的 pK_a 值未变，因此它代表了羧基，而 pK_{a2} 值降低（见图 3－2 中的不连续曲线部分）。降低的程度依赖于甲醛的浓度。因此，pK_{a2} 反应了氨基的解离。

总的来说，在简单化合物中，羧基酸性要强于—NH_3^+ 基。羧基 pK_a 值一般小于 5，而—NH_3^+ 基则大于 7。

问题：为什么甘氨酸的羧基 pK_a 值（2.3）要小于乙酸的 pK_a 值（4.7）？

在 pH 值小于 6 的甘氨酸溶液中，氨基带正荷。这些正电荷可以通过电平衡相互作用来抵销羧基所带的负电荷，也就是说甘氨酸的羧基更容易失去质子，因此酸性更强（pK_a 值较小）。

氨基酸的酸碱性

一些氨基酸带有质子转移作用的侧链，例如：天冬氨酸和谷氨酸有一个额外的羧基，组氨酸有一个咪唑基，赖氨酸有一个额外的氨基，以及精氨酸带有胍基。这些侧链的结构式见表 3.1，其 pK_a 值列于表 3.2。

表 3.2 一些氨基酸的 pK_a 值

氨基酸	pK_{a1}（α-COOH）	pK_a（α-NH_3^+）	pK_{aR}（侧链）
甘氨酸	2.3	9.6	—
丝氨酸	2.2	9.2	—
丙氨酸	2.3	9.7	—
缬氨酸	2.3	9.6	—
亮氨酸	2.4	9.6	—
天冬氨酸	2.1	9.8	3.9
谷氨酸	2.2	9.7	4.3
组氨酸	1.8	9.2	6.0
半胱氨酸	1.7	10.8	8.3
酪氨酸	2.2	9.1	10.1
赖氨酸	2.2	9.0	10.5
精氨酸	2.2	9.0	12.5

这些氨基酸的滴定曲线都有一个额外的曲折，如图 3－3 所示谷氨酸的滴定曲线那样。

碱性氨基酸的电荷

如前所述，氨基酸不同基团所带电荷依赖溶液的 pH 值：

1. 羧基和酪氨酸侧链的质子化形式是不带电的，而去质子化形式则带负电荷，或称为阴离子形式。

2. 氨基、组氨酸的咪唑基及精氨酸的胍基的质子化形式是带正电荷（阳离子），而去质子形式则不带电荷。

当溶液的 pH 值低于某基团的 pK_a 时，溶液偏酸性，基团质子化形式占优势。当溶液 pH 值高于该基团的 pK_a 时，基团失去质子，即—COOH 基变为带负电形式的—COO^-，而带正电荷的酸形式的氨基—NH_3^+，则成为不带电的 NH_2。

等电点

根据上述讨论，参照表 3.2 所给出的基团的 pK_a 值，可计算上例中谷氨酸的等电点。

当 pH 小于 2.2 时，所有基团均质于化。图 3－3 滴定曲线中各点谷氨酸解离的主要形式列于下表：

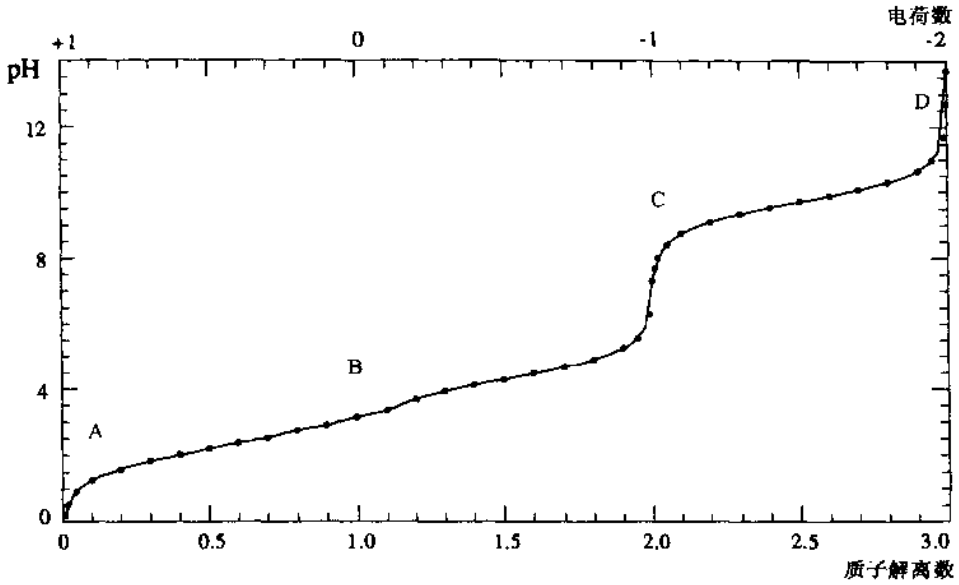


图 3-3 10mmol 谷氨酸-盐酸盐用 NaOH 滴定曲线

点	带电形式	电荷数
A (pH 1)	$^{+}NH_3-CH(CH_2CH_2COOH)-COOH$	+1
B (pH 3.25)	$^{+}NH_3-CH(CH_2CH_2COOH)-COO^{-}$	0
C (pH 7)	$^{+}NH_3-CH(CH_2CH_2COO^{-})-COO^{-}$	-1
D (pH 12)	$NH_2-CH(CH_2CH_2COO^{-})-COO$	-2

当溶液 pH 值从 2.2 开始增加，在接近 pH 3 的时候，α-羧基解离产生兼性离子。当 pH 值增加到 4.3 时，侧链中的羧基也解离使得谷氨酸分子带两个负电荷一个正电荷（即净电荷为 -1）。注意在 pH 7 左右（即中性溶液时），谷氨酸和天冬氨酸均分别以带离子化侧链的谷氨酸盐和天冬氨酸盐形式存在。最后，当溶液 pH 值继续升高大于 pK_{a2}，氨基解离使谷氨酸带电荷数为-2。谷氨酸的等电点是取兼性离子两边的 pK_a 值 2.2 和 4.3 的平均值。

因此，谷氨酸的等电点可表示为：

$$pI = (pK_{a1} + pK_{aR})/2 = (2.2 + 4.3)/2 = 6.5/2 = 3.25$$

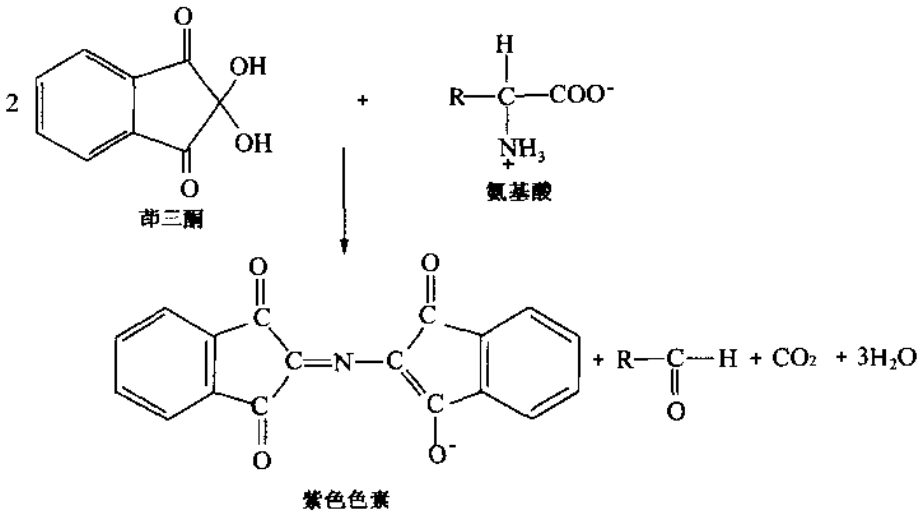
故作为一个总的原则，氨基酸的等电点是指两侧质子化转变的 pK_a 值的平均值。这

原则提示氨基酸具有不同的带电形式。

3.3 氨基酸分析

蛋白质水解为氨基酸后（通常在浓 HCl 中进行），氨基酸可通过离子交换色谱进行分离。相继利用三种高 pH 值缓冲液将氨基酸从色谱柱上洗脱下来。洗脱顺序依赖于氨基酸所带电荷。碱性氨基酸（赖氨酸、组氨酸和精氨酸）与带负电荷的离子交换树脂，结合更为紧密。应用这一技术，可分析某一蛋白质的氨基酸组成。通过测定每种氨基酸的浓度，也可得知蛋白质中哪些氨基酸较为丰富。化合物茚三酮可与氨基酸反应生成紫色的衍生物。通过测定 570nm 下生成的紫色溶液的吸光值，可得出每种氨基酸的相对浓度值（图 3－4）。

氨基酸与茚三酮反应：



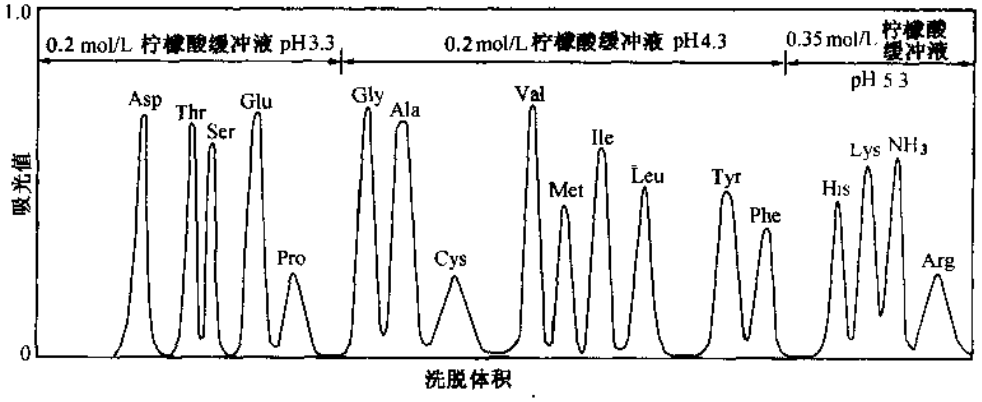


图 3－4　通过离子交换色谱分离氨基酸。峰面积与溶液中相应氨基酸的含量成正比

但脯氨酸与茚三酮反应不生成紫色物质而产生淡黄色衍生物，具此亦可定量测定脯氨酸。进行氨基酸分析时脯氨酸很易在色谱图上定位，这是因为与其他氨基酸相比，脯氨酸在 570nm 和 440nm 的吸收峰的相对高度是相反的。

例 3.8

水解某肽后，水解液进行氨基酸分析，结果如下表所示：

氨基酸	μmol
Asp	1.21
Ser	0.60
Gly	1.78
Leu	0.58
Lys	0.61

确定该肽的氨基酸组成比例经验公式。

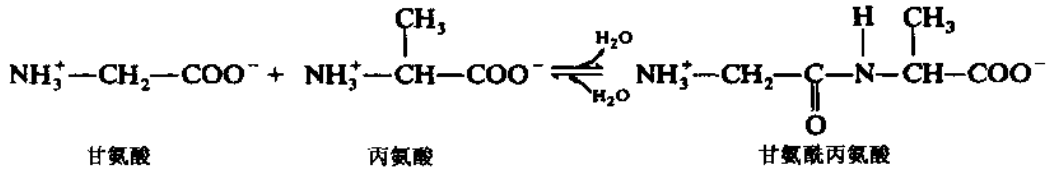
可将亮氨酸作为一个参照标准，然后确定其他氨基酸与亮氨酸的相对比例，于是得出如下表的化学计量结果：

氨基酸	相对含量
Asp	2.086
Ser	1.03
Gly	3.07
Leu	1.00
Lys	1.05

由于肽中氨基酸含量一定为整数，故表中数据可进行四舍五入地近似处理而得到肽的最可能的氨基酸组成比例经验公式：Asp_2，Ser，Gly_3，Leu，Lys。

3.4 肽键

蛋白质分子中α-氨基酸以线性序列相连接。一个氨基酸的α-羧基与其相邻的另一氨基酸α-氨基通过一特殊的酰胺键——肽键相连接。肽键通过一需能的缩合反应而生成：



甘氨酸　　丙氨酸　　甘氨酰丙氨酸

注意羧基和氨基在缩合形成肽键后即失去其相应的酸性和碱性。肽键水解为游离氨基酸是一个自发的过程，但在中性溶液中通常极其缓慢。

肽的命名

命名肽时，以具有游离子α-NH_3^+（N端）的氨基酸开始并用-yl（酰）结尾来取代-ine（酸）结尾（最后一个氨基酸除外，仍命名为酸）。肽中的氨基酸被称为残基，因为它们是肽键形成过程中脱水后剩余的部分。

例 3.9

区别两个二肽：甘氨酰丙氨酸与丙氨酰甘氨酸。

因为肽命名是以氨基末端开始；故甘氨酰丙氨酸的Gly上有一个游离的α-氨基，而游离羧基则位于Ala上。

这两个二肽是序列异构体的实例；它们均由同样的氨基酸构成，但它们的连接顺序不同。

肽

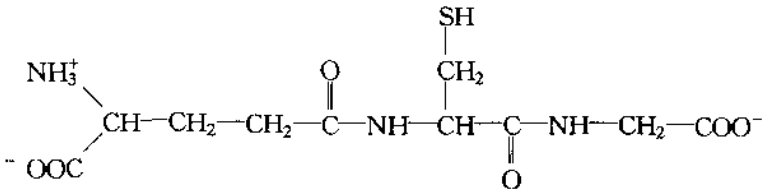
两个氨基酸通过肽键相连而形成的化合物称为二肽；由三个氨基酸所组成的肽就称为三肽，以此类推。寡肽是由具体数目并未限定但通常是少数几个氨基酸所组成的肽。而多肽则用大量氨基酸所组成。天然存在的50个或50个以上氨基酸组成的多肽即为蛋白质。（见第

4章）

例 3.10

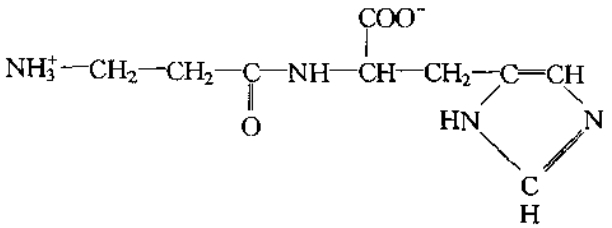
下列寡肽并非来自蛋白质。如何根据其结构分析进行论证？

(a) 谷胱甘肽（γ-L-谷氨酰-L-半胱氨酰甘氨酸）



谷氨酸与半胱氨酸之间的肽键是通过谷氨酸的γ-羧基而不是α-羧基形成的。所有的天然蛋白质均为α-肽键（除非合成后又被修饰）。

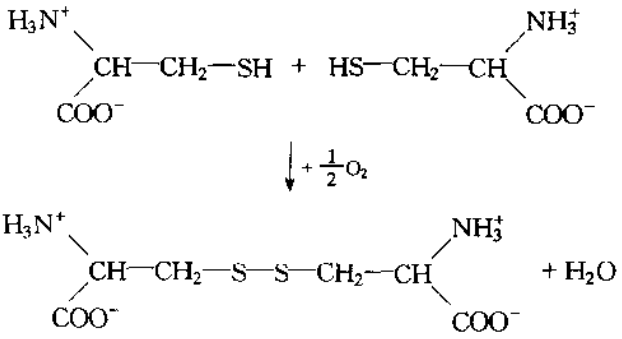
(b) 肌肽



该化合物含有β-丙氨酸。天然蛋白质由α-氨基酸所组成。

3.5 半胱氨酸反应

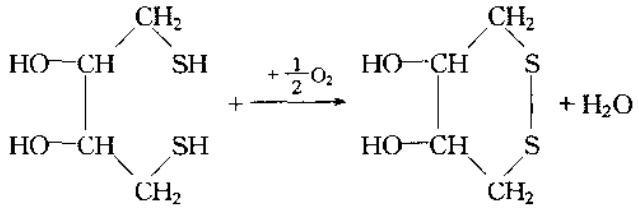
由于半胱氨酸可氧化生成含二硫键的氨基酸胱氨酸，故其侧链—SH很重要。



如果半胱氨酸的侧链在三级结构上（见第4章）彼此足够接近就可以形成二硫键（二硫桥），故二硫键在蛋白质中很常见。此外，若某些蛋白质分子表面的游离—SH基氧化，则可使两个不同的蛋白质分子通过二硫键而共价连接。这一过程是生物体中不希望发生的，故细胞内常含有一些还原剂来阻断或逆转该反应。这些还原剂中最常见的是谷胱甘肽；它能将氧化形式的二硫键还原为—SH形式，而其本身在这一过程中被氧化。细胞中还存在其他与代谢相偶联的还原系统可将谷胱甘肽再次还原。

在实验室中可用与谷胱甘肽结构相似的也含有游离—SH的试剂将二硫键切断。其中最常用的试剂是巯基乙醇，$HO—CH_2—CH_2—SH$。

还有一些更强的二硫键还原剂（标准还原电位较低，见第10章）；如二硫苏糖醇含有两个—SH基，其被氧化后所形成的闭环化合物含有非常稳定的二硫键。因此，与巯基乙醇相比，二硫苏糖醇的还原能力要强几个数量级。



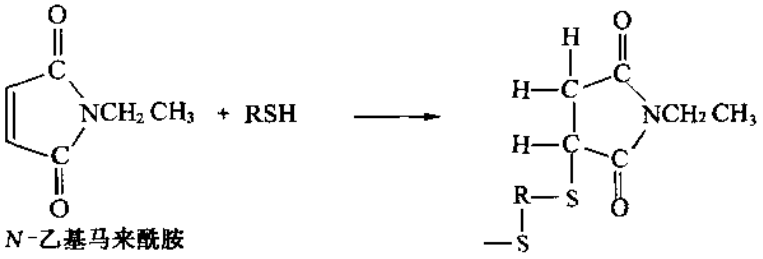
还原型二硫苏糖醇　　氧化型二硫苏糖醇

防止—SH的氧化通常是必要的，因为二硫键可使蛋白质不易溶解或不能测序。用一些化学试剂即可“封闭”活泼的—SH基，防止其被氧化。

1. 吲哚乙酸。该试剂与巯基反应可形成半胱氨酸残基S-羧甲基衍生物。

$$R—SH + I—CH_2—COO^- \longrightarrow RS—CH_2—COO^- + HI$$

2. *N*-乙基马来酰胺。该试剂与巯基反应后在305nm的吸光值将会降低，可用这一特性来检测反应的程度：



N-乙基马来酰胺

例 3.11

在浓度为2mg/ml的某蛋白质溶液中加入过量的*N*-乙基马来酰胺。在305nm，比色杯光径为1cm时进行比色，吸光值从0.26下降到0.20。若*N*-乙基马来酰胺的摩尔吸光系数为620Lmol^{-1}cm^{-1}，(a) 计算溶液中巯基的浓度？(b) 假设每个蛋白质分子只含1个半胱氨酸残基，则该蛋白质的分子量为多少？

(a) 样品溶液中巯基的初浓度与*N*-乙基马来酰胺浓度的下降相等。根据所给出的吸光值的浓度，由比尔-朗伯定律（见公式3.1）即可测定*N*-乙基马来酰胺浓度的改变：

$$A = \varepsilon C l$$

$$\Delta C = \frac{\Delta A}{\varepsilon l} = \frac{0.26 - 0.20}{620 \times 1.0} = \frac{0.06}{620} = 9.8 \times 10^{-5} \text{mol L}^{-1}$$

(b) 蛋白质的浓度是2mg ml^{-1}，或2g L^{-1}。因为1分子蛋白质只含1分子巯基，则蛋白质的摩尔浓度亦为9.8×10^{-5}mol L^{-1}，

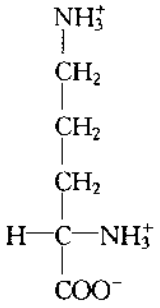
则其相对分子质量$= 2/(9.8 \times 10^{-5})$；即$M_r = 20400$。

问题解答

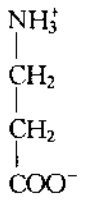
氨基酸

3.1　下列哪些化合物属α-氨基酸？

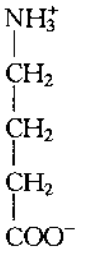
答：



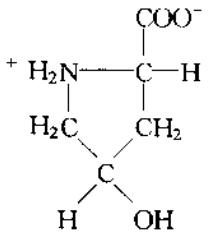
(a) 鸟氨酸



(b) β-丙氨酸



(c) γ-氨基丁酸



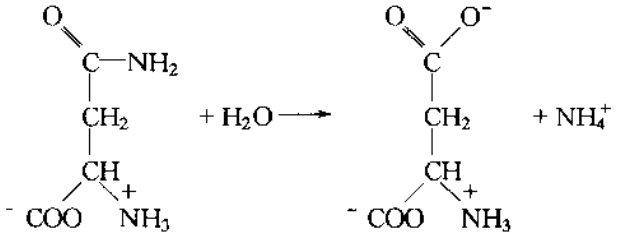
(d) 羟脯氨酸

鸟氨酸 (a) 与羟脯氨酸 (d) 均为 α-氨基酸，因为它们的氨基与羧基均与同一个碳原子相连。虽然鸟氨酸在蛋白质组成中并不存在，但却是尿素循环中的一个中间产物(见 15 章)。β-丙氨酸 (b) 和 γ-氨基丁酸 (c)，它们的氨基与羧基分别与不同的碳原子相连，分别属于 β-及-γ 氨基酸。严格地说脯氨酸是一种亚氨基酸，因为它的氨基氮与侧链共价连接。它有时也称之为亚氨基酸。

3.2 通过温和水解释放氨后，哪种氨基酸可转变成另外一种不同的氨基酸?

答：

谷氨酰胺与天冬酰胺均有酰胺侧链。酰胺水解后形成羧基与游离氨。



天冬酰胺　　天冬氨酸

3.3 为什么苯丙氨酸极难溶于水，而丝氨酸则易溶于水?

答：

Phe 的侧链为非极性侧链，且其水溶过程伴随着熵减少，因此不易进行。另一方面 Ser 的侧链含有极性的—OH，可与水形成氢键，故极易溶。

3.4 许多蛋白质都在 280nm 紫外区有强的光吸收，而白明胶却没有。请解释原因 。

答：

许多蛋白质在紫外区有光吸收是因为它们含有芳香族侧链的氨基酸。白明胶，一种胶原的衍生物（见第 4 章）其组成比较特殊，含芳香族氨基酸的比例很低。

氨基酸的酸碱性质

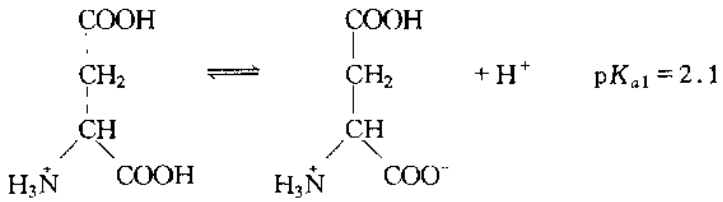
3.5 写出下列弱酸的共轭碱：(a) CH_3COOH；(b) NH_4^+；(c) $H_2PO_4^-$；(d) $CH_3NH_3^+$

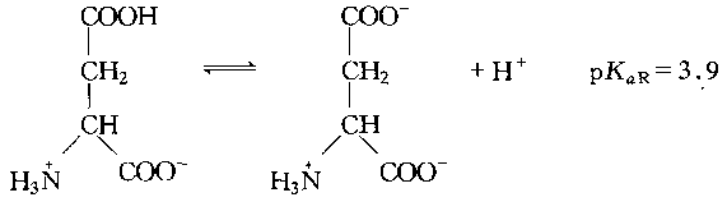
答：

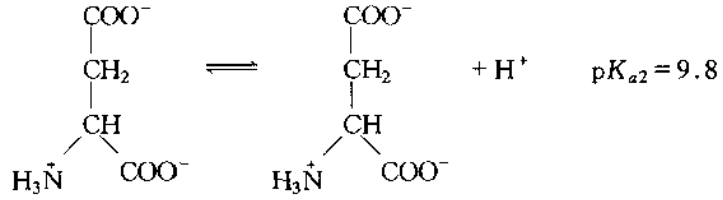
每种酸通过失去一个质子而形成它的共轭碱。因此这些酸的共轭碱分别是：(a) CH_3COO^-；(b) NH_3；(c) HPO_4^{2-}；(d) CH_3NH_2

3.6 写出天冬氨酸的解离方程式。指出每种形式所带的净电荷数。

答：







3.7 利用题3.6的内容，计算天冬氨酸的等电点pI。

答：

由于等电点是pK_a分别为2.1和3.9之间的平均值，故

$$pI=\frac{2.1+3.9}{2}=3.0$$

3.8 计算0.1mol/L乙酸的pH值（$pK_a=4.7$）。

答：

乙酸虽是一种弱酸，但酸性要大于水。故第一步近似处理时，可忽略从水中解离出的质子而用下式代表乙酸的解离。

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

现在可近似地认为$[H^+]=[CH_3COO^-]=x$。

另外，由于乙酸是弱酸，故未解离乙酸的浓度不会由于解离而明显下降。则可假定为$[CH_3COOH]=0.1mol/L$。

所以，

$$K_a=\frac{[CH_3COO^-][H^+]}{[CH_3COOH]}\approx\frac{x^2}{0.1}$$

$$x^2=0.1\times K_a=0.1\times 10^{-4.7}$$

故 $$x=0.0014mol\ L^{-1} \quad 且\ pH=2.85$$

注意：以上所做的第二次假设可通过设$[CH_3COOH]=0.1-x$及解二次方程求x来进行检验。可得pH=2.80。所得答案与简化假设形式相差不大，故以上所假设是合理的。

3.9 谷氨酸溶液pH值为多少时，能成为良好的缓冲液？

答：

从图3-3可以看出，在pK_a值附近，即pH为2.2，4.3和9.7附近时，用NaOH滴定谷氨酸溶液时，其pH值改变最为缓慢。

3.10 氨基酸在以下哪一 pH 值时为最佳缓冲液？(a) 2.0，(b) 6.0，(c) 4.5，(d) 9？(可参考表 3.2)

答：

(a) 所有氨基酸均含有一个 pK_a 接近 2.0 的羧基。因此在该 pH 范围内，所有氨基酸均为良好的缓冲液。

(b) 组氨酸含有一 pK_a 接近 6 的侧链基团。故在 pH 为 6.0 时组氨酸具有良好的缓冲能力，图 3-2 显示简单氨基酸在此 pH 下缓冲能力十分有限。

(c) 谷氨酸的侧链 pK 值接近 4.5，故谷氨酸在该 pH 区域具有缓冲能力。

(d) 所有的氨基酸其 α-氨基 pK_a 值约为 9，故所有的氨基酸在此 pH 下见有良好的缓冲能力。

3.11 利用溶液的 pH 值与某具有质子转移能力的基团的 pK_a 值，推导出一个通用公式来计算该基团的平均净电荷数 (Z)。

答：

将 Henderson-Hasselbalch 方程重排，可得：

$$\frac{[\text{酸}]}{[\text{共轭碱}]}=10^{(pK_a-pH)}$$

若将该基团的酸性成分设为 α，则

$$\alpha=\frac{[\text{酸}]}{[\text{酸}]+[\text{共轭碱}]}=\frac{10^{(pK_a-pH)}}{1+10^{(pK_a-pH)}}$$

$$=\frac{1}{10^{(pK_a-pH)}+1}$$

因此，若该基团（例如氨基）为阳离子酸形式，则 α 代表该正电荷成分：

$$Z=+\alpha=\frac{+1}{1+10^{(pH-pK_a)}}$$

注意：当 $pH \ll pK_a$ 时，Z 约等于 +1。

另一种情况，有些基团，例如羧基，为中性酸形式，有阴离子共轭碱，则 α 代表该基团的不带电荷成分，则带电成分的电荷数为

$$Z=-(1-\alpha)=\alpha-1=\frac{-1}{1+10^{(pK_a-pH)}}$$

此时，当 $pH \ll pK_a$ 时，Z 约等于 0。

总之，当 pH 值低于 pK_a 值 2 个单位以下，则认为基团已完全质子化。

3.12 利用表 3.2 中所列出的 Asp 的 pK_a 值，当溶液 pH 值为 1.0，3.9，6.8 时，求 Asp 分子的平均净电荷数。

答：

由习题 3.11 的推导公式可知，在每个 pH 值时，Asp 的三个质子转移基团的平均净电荷数都可分别算出，其结果如下：

基　团	平均电荷		
	pH 1.0	pH 3.9	pH 6.8
α-COOH	-0.07	-0.98	-1.0
β-COOH	0	-0.5	-1.0
α-NH_3^+	+1.0	+1.0	+1.0
平均净电荷数	+0.93	-0.48	-1.0

3.13 大多数的氨基酸，其 α-羧基的 pK_a 值都在 2.0 左右，其 α-氨基的 pK_a 值都在 9.0 左右。然而，肽中的 α-羧基 pK_a 值为 3.8，α-氨基 pK_a 值为 7.8。请解释这些差异。

答：

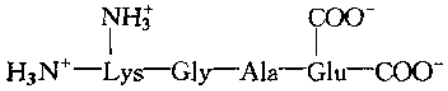
在游离氨基酸中，相邻基团所带的电荷影响了每一个基团的 pK_a 值。$—NH_3^+$ 基所具有的正电荷可稳定$—LOO^-$基所带的负电荷，使得羧基酸性更强；反之，羧基所带的负电荷可稳定氨基的正电荷，使得氨基酸性减弱，pK_a 值升高。氨基酸形成肽时，游离 α-氨基与羧基相隔较远，因此相互影响较小。

第二个影响是肽中第一个氨基酸的羧基对末端 α-氨基具有电子吸引作用，故降低了 $—NH_3^+$ 的稳定性且使其 pK_a 值轻度下降。

3.14 预测肽：Lys-Gly-Ala-Glu 在 pH 为 6.0 时的电泳迁移方向（移向阳极，阴极或固定不动）。

答：

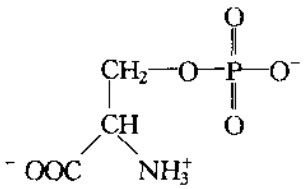
肽中的 $α-NH_3^+$ 与 $α-LOO^-$ 在形成肽键中即已失去；仅保留 N 端的 $α-NH_3^+$ 及 C 端的 α-羧基。此外，对于该题中的肽，Lys 有一 pH 为 6.0 的带正电荷的侧链基团，Glu 含有一个羧基。Lys 中两个氨基其 pK_a 值均大于 8。故在 pH 为 6.0 时，这两个氨基几乎完全质子化而带上正电荷。Glu 的两个羧基 pK_a 值均在 4 左右，故在 pH 为 6.0 时这两个羧基几乎完全去质子化。因此该肽可写成以下的形式：



净电荷为 0。故该肽将静止不动。

氨基酸分析

3.15 磷酸丝氨酸



可在酪蛋白，一种奶中存在的蛋白质的酶水解产物中找到，然而该化合物并不属于编码蛋白质的 20 种氨基酸之列。解释原因。

答：

合成酪蛋白时，Ser 参加该蛋白质的序列合成。然后，其中的一些 Ser 残基通过磷酸化而形成磷酸丝氨酸。

3.16 图 3-4 的氨基酸洗脱峰图谱显示 Gly、Ala、Val 及 Leu 可用离子交换色谱清楚地分离开；而这四种氨基酸的 pK_a 值却非常接近（见表 3.2）。解释原因。

答：

这四种氨基酸极性不同。离子交换树脂中与带电基团相结合的聚苯乙烯载体相对不带电荷，通过隔离作用及离子交换可进行部分分离。有些氨基酸，例如 Leu 与树脂的相互作用要强于极性更强的氨基酸，如 Ser，因这种与树脂的相互作用可使 Leu 从柱中的洗脱延迟。

3.17 水解一个小肽后进行氨基酸分析。另外，由于酸水解破坏了 Trp，用分光光度计比色时 Trp 含量消失。从以下数据中，确定该小肽的氨基酸组成比例。

氨基酸	含量/μmol
Ala	2.74
Glu	1.41
Leu	0.69
Lys	2.81
Arg	0.72
Trp	0.65

答：

将 Leu 作为参考标准，可确定该肽中氨基酸的摩尔比值，分别是 3.97、2.04、1.00、4.07、1.04、0.94 。将这些值近似处理后可得该肽的氨基酸组成比例：Ala_4，Glu_2，Leu，Lys_4，Arg，Trp。

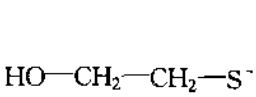
补充问题

3.18　列出侧链基团可作为（a）氢键供体；（b）氢键受体的氨基酸。

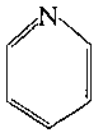
3.19　列出对紫外光有强吸收的氨基酸。

3.20　蛋白质中哪种氨基酸没有旋光性？

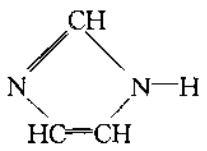
3.21　写出下列弱碱的共轭酸：



(a)



(b)



(c)

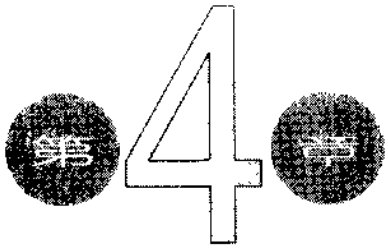
3.22　计算 Arg 的等电点。

3.23　计算 His 的等电点。

3.24　计算 1mol/L 乙酸的 pH 值。

3.25　在下列 pH 值时：(a) 2.0；(b) 5.0；(c) 10.0，Lys 所带的平均净电荷数是多少？

3.26　利用习题 3.13 所推导出的关于具有质子转移作用的基团所带平均净电荷数的计算方式，计算肽甘氨酰甘氨酰甘氨酸在 pH 值分别为（a）2.0；（b）5.0；（c）9.0 时的平均净电荷数。



蛋白质

4.1 导言

蛋白质是天然存在的分子质量大于 5 000 的多肽。这些蛋白质分子物理性质千差万别，从水溶性的酶到不溶的毛发和角，均属蛋白质，且其生物学功能也是多种多样。

蛋白质具有什么样的生物学功能?

蛋白质执行下列生物学功能：

1. 酶的催化。酶是蛋白质类催化剂，能以高达 10^{12}倍的速率提高反应速度。
2. 运输和贮存。许多小分子和离子与载体蛋白相结合才能在血液中及细胞内运输。最典型的例子是运氧蛋白——血红蛋白。
   通过称为铁蛋白的蛋白质，铁可贮存于各种组织中。
3. 机械强度。蛋白质可作为结构成分起作用。胶原蛋白提供了皮肤，牙齿，及骨骼的强力强度。围绕细胞和细胞器的质膜，其中一部分也是由蛋白质组成，蛋白质在这其中既是组成结构的一部分，也具有一定的功能。
4. 运动。肌肉收缩是由两种纤维状蛋白质，即肌动蛋白和肌球蛋白的相互作用来完成的。肌球蛋白也具有酶活性，可将 ATP 的化学能转化为机械能。
5. 保护作用。抗体是蛋白质，在补体，一组复杂的蛋白质的协同下，共同破坏外来入侵异物。
6. 信息处理。细胞外的刺激物，例如激素分子或光强度作用于细胞可通过一种特异蛋白质介导将细胞外信号传入细胞内。一个典型例子是视蛋白：视紫红质，它位于细胞膜上。

问题：根据蛋白质的结构，请解释以上列出的蛋白质功能的共同特性是什么?

上面所举的例子，都涉及到特异结合现象。例如，Hb 与氧分子特异结合，抗体与特异抗原相结合，酶与特异的底物分子结合并导致选择性化学键重排。因此可将蛋白质的功能理解为蛋白质的结构如何允许其与特定分子进行特异性结合。

4.2 蛋白质的纯化与鉴定

纯化

蛋白质分子纯化的第一步通常都包括将蛋白质分子从其他的低分子质量溶质中分离出来。利用其物理性质如所带电荷，分子大小，以及在不同溶剂中溶解度的差异可将不同蛋白质进行一定程度的分离。最后，利用亲和层析，即根据蛋白质与层析柱上固相载体所连接的

特定化合物具有特异亲和力的特性可获得高纯度的蛋白质。

透析

蛋白质是大分子量化合物，即定义所指的相对分子质量超过 5 000 的大分子。故不能透过玻璃纸膜（透析膜），而该膜可允许较小的分子自由通过。这种选择性的通透能力是透析过程的基础。透析时将蛋白质溶液装入一个透析袋中，并将该透析袋浸没在一大体积的缓冲液内。小分子通过扩散透过透析袋进入周围的缓冲液中，而蛋白质则留在袋内，不同的透析袋可透析相对分子质量从 1 000 到 10 000 的各种分子。

选择性溶解

通过加入①中性盐，如硫酸铵（盐析），②有机溶剂，如乙醇或丙酮，或③强沉淀剂，如三氯乙酸，可从不同蛋白质的混合液中将某种蛋白质选择性地沉淀下来。当溶液的 H 值等于某蛋白质的等电点（pI）时，蛋白质溶解度最低。在等电点时，蛋白质所带净电荷为零，故蛋白质分子间的电荷排斥力最小。虽然蛋白质在等电点时既可含有带正电的基团又可含有带负电的基团，但电荷总数为零。当 pH 大于等电点时，蛋白质所带净电荷为负值，而 pH 值小于 pI 时，所带净电荷为正。

电泳

带电荷的蛋白质分子在电场中的运动，称为电泳。这是一种分离不同蛋白质分子的重要方式，在电泳时，若能降低（热）对溶质的影响，则蛋白质可被分成很窄的区带，例如，用纸或聚丙烯酰胺凝胶作为稳定支持物时的电泳。

在电泳中经常用到阳极与阴极这两个易混术语。注意：阴离子是带负电荷的离子，向阳极泳动。

例 4.1

在电场中下列蛋白质将向哪个方向泳动？[向阳极，或阴极，或既不向阳极也不向阴极（即固定不动）]（a）卵清蛋白（pI＝4.6）溶液 pH 为 5.0；（b）pH 为 5.0 时及 7.0 时的β乳球蛋白（pI＝5.2）。

(a) 对于卵清蛋白，pH 为 5.0 时高于其等电点，故蛋白质带有少量负电荷。故向阳极移动。

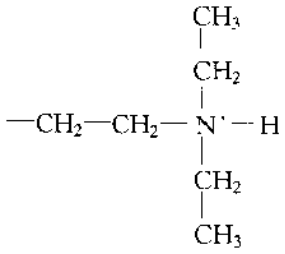
(b) 对于β乳球蛋白，pH5.0 则低于其等电点，蛋白质带正电荷，向阴极泳动。相反，pH7.0 时蛋白质带负电；向阳极移动。

离子交换色谱

离子交换色谱的原理是利用带电荷的蛋白质与固定的离子交换树脂上所带的相反电荷之间的相互作用来分离不同的蛋白质。蛋白质与树脂颗粒间结合的牢固程度取决于蛋白质的带电量（亦即取决于溶液的 pH 值）及介质的介电常数［参见公式（4.2）］。在实践中通过改变溶液中的 pH 值或盐浓度可改变蛋白质与树脂间的相互作用。

例 4.2

含有乳清蛋白（pI＝4.6），β乳球蛋白（pI＝5.2），以及胰凝乳蛋白酶原（pI＝9.5）的溶液用二乙胺乙基纤维素（DEAE－纤维素）pH 为 5.4 时的层析柱分离。然后用 pH 为 5.4 的缓冲液洗脱，缓冲液中盐浓度逐步增加，请预测三种待分离蛋白质组分的洗脱顺序。



乙二胺乙基（DEAE）基团结构式

在pH为5.4时，DEAE-纤维素带正电荷。在此pH条件下，胰凝乳蛋白酶原亦带正电荷，故不与DEAE-纤维素结合。β乳球蛋白带少量负电荷，与DEAE-纤维素结合力极弱，随着洗脱缓冲液中盐浓度的增加，它将被置换下来。而乳清蛋白带大量负电荷，与DEAE-纤维素结合十分紧密，只有当缓冲液中盐浓度很高时才可被洗脱下来，或降低缓冲液的pH值，使乳清蛋白所带负电荷量减少，才可被洗脱下来。

凝胶过滤

利用蛋白质的分子大小将蛋白质进行分离的方法即为凝胶过滤。这种方法是靠蛋白质扩散入分离柱中凝胶基质的孔中进行的。常用的凝胶类型是葡聚糖，它是一种以小珠形式存在的葡萄糖的多聚体。其商品名称为交联葡聚糖（Sephadex），有不同孔径的规格。

若蛋白质分子大小超过了凝胶的最大孔径，则蛋白质不能扩散进入凝胶颗粒，而被很快地洗脱下来。蛋白质分子大小若小于凝胶的最小孔径，则它可自由扩散入所有的凝胶颗粒中，只有最大量缓冲液洗脱，它才会从柱中被洗脱出来。

例4.3

以下蛋白质混合物用Sephadex G-200凝胶过滤分离，将以何顺序被分别洗脱下来：肌红蛋白（相对分子质量=16 000），过氧化氢酶（相对分子质量=500 000），细胞色素c（相对分子质量=12 000），胰凝乳蛋白酶原（相对分子质量=26 000）以及血清白蛋白（相对分子质量=65 000）。

在这一组混合物中过氧化氢酶相对分子质量最大，则可以Sephadex颗粒间完全排出（Sephadex的颗粒孔径排出相对分子质量高限大约为200 000）。即对过氧化氢酶分子来说，Sephadex颗粒好像是固体，而酶分子只能溶于凝胶颗粒外的液体中（即无效体积中）。只要通过柱的洗脱液体积等于该无效体积时，酶分子则可被完全洗出。

细胞色素c是这一组蛋白质中分子质量最小的一个，它可自由扩散进入所有凝胶颗粒中。对于该蛋白质来说，有效柱体积增大，只有当流过柱的洗脱液体积几乎等于全部有效柱体积时，细胞色素c才能被洗脱下来。

故该组蛋白质混合物的洗脱顺序是：过氧化氢酶，血清白蛋白，胰凝乳蛋白酶原，肌红蛋白以及细胞色素c。

蛋白质测序

肽与蛋白质的结构和性质主要由肽链中的氨基酸序列决定。F. Sanger于1953年第一个测定了胰岛素（由51个氨基酸残基组成）的氨基酸序列。这是人类每一次完整地测定了一个蛋白质的全部氨基酸序列。这一测序过程目前可用蛋白质序列仪自动完成，其原理是利用Edman降解法这一化学方法，N端一个一个地逐步鉴定蛋白质的氨基酸顺序。

N端测序法

N端残基，即肽序列中第一个氨基酸，可通过与异硫氰酸苯酯进行反应来测定。在中性

pH条件下，它可与α-氨基反应。然后用温和酸水解，反应产物环化，以苯乙内酰硫脲(PTH)衍生物形式释放末端氨基酸残基。(Edman降解法，见图4-1)。分析该衍生物可得知其氨基酸种类及数量。

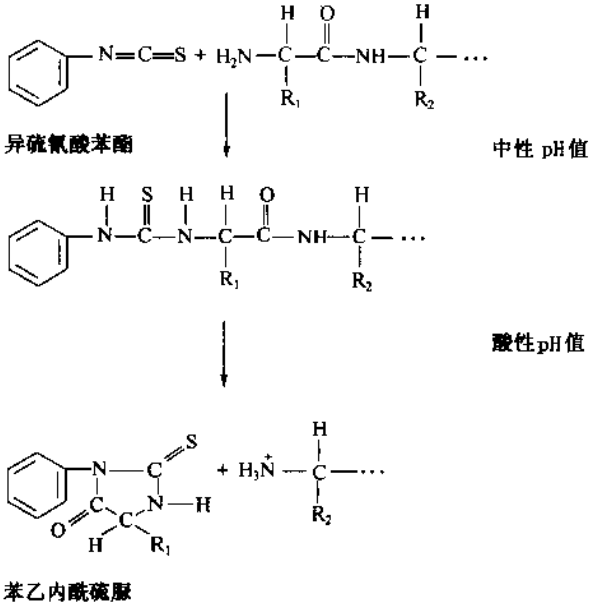
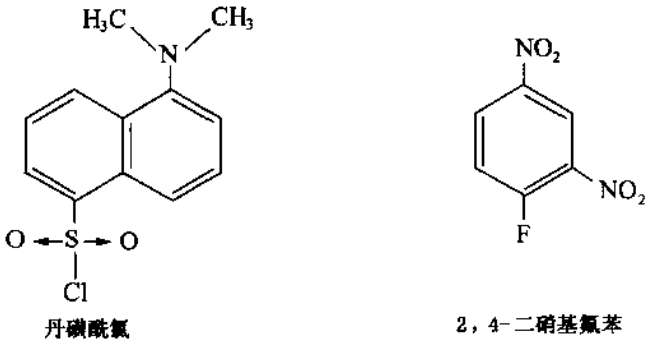


图4-1 Edman降解

其他可与氨基末端残基反应的试剂，如丹磺酰氯和2,4-二硝基氟苯，也可用来进行蛋白质的N端氨基酸分析。



例4.4

利用N端残基的定性定量法，描述测定蛋白质全部序列的一种方法。

利用异硫氰酸苯酯法，在温和的反应条件下的第一步时，蛋白质N端氨基酸残基被环化并水解释出，而其余肽链未被反应。这时失去了最初N端残基的肽链可继续与异硫氰酸苯酯反应，同理可测出该蛋白质N端第二个氨基酸的种类，如此循环下去，则可测出蛋白质的全部氨基酸序列。但是，实际上，在每次循环中，都有一些肽被有限水解或不完全水解，在10到20次循环后，这些不完全水解造成的积累使得测序无法进行下去。

肽的特异性裂解

许多蛋白质都由上百个氨基酸残基组成，不可能一次性测定这类蛋白质的全部序列，这是由于在每步反应中不完全水解的积累所造成的。故首先应将蛋白质切成一些可操作的小片段，再进行测序就会很方便了。有些蛋白质肽链，不同部位的Cys残基间可形成二硫键；测

序前须先将这些二硫键断开。

• 胰蛋白酶

将多肽链水解为小片段的一种最常用的酶是胰蛋白酶。这种由胰腺产生的消化酶，可在 Lys 和 Arg（即带正电荷的氨基酸）残基的羧基侧水解肽键：

$$R_1\text{-Lys-Ala-}R_2 \xrightarrow{\text{胰蛋白酶}} R_1\text{-Lys-}COO^- + NH_3^+\text{-Ala-}R_2$$

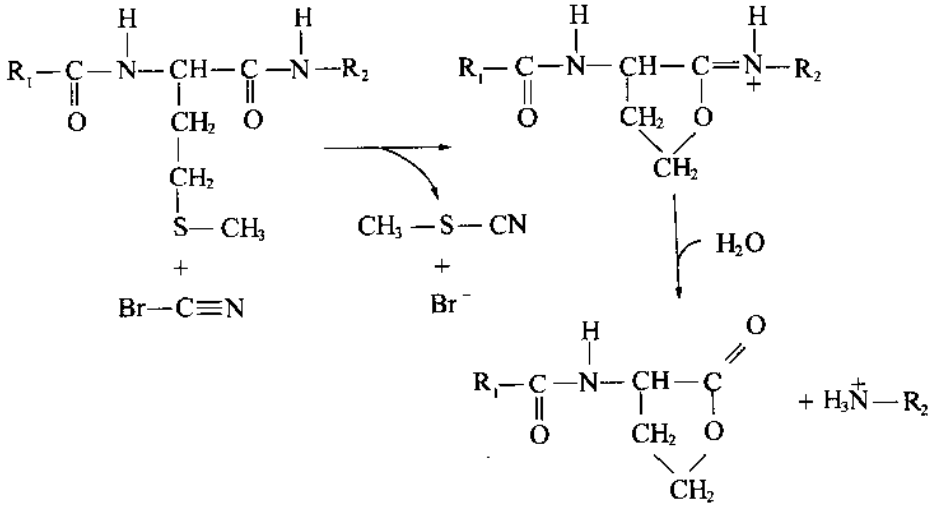
• 胰凝乳蛋白酶

另一种常用于选择性断裂肽链的酶是胰凝乳蛋白酶，它在芳香族氨基酸（Phe，Tyr 以及 Trp）残基的羧基侧水解肽键：

$$R_1\text{-Phe-Ser-}R_2 \xrightarrow{\text{胰凝乳蛋白酶}} R_1\text{-Phe-}COO^- + NH_3^+\text{-Ser-}R_2$$

• 溴化氰裂解法

溴化氰（CNBr）裂解法是一种化学的而非酶法的特异性断裂多肽链的方法，它可从 Met 残基处断开多肽链：



重叠肽

蛋白质被切成可操作的小肽段后，每一肽段的序列均被测出，下一步则是将这些小肽段按原有顺序正确地连接起来。为此，就需要对同一蛋白质用不同的选择性断裂方法裂解，提供至少两套不同的小肽序列。

例 4.5

一个肽用溴化氰（CNBr）切成两个小肽段，又用胰蛋白酶（Tryp）切成另外两个小肽段。这两套小肽段的序列如下：CNBr 1，Gly-Lys-Ala-Glu；CNBr 2，Ser-Met；Tryp 1，Ser-Met-Gly-Thr-Lys；Tryp 2，Ala-Glu。确定该肽的序列。通过以下重叠肽的序列排列，可求出该肽的氨基酸组成顺序：

CNBr 2：Ser-Met

Tryp 1：Ser-Met-Gly-Thr-Lys-

CNBr 1：Gly-Thr-Lys-Ala-Glu

Tryp 2：Ala-Glu

Ser-Met-Gly-Thr-Lys-Ala-Glu

注意：以上所给出的条件有些是多余的；利用 Tryp 1 与 CNBr 1 两个重叠肽段就足可求出该肽的序列。另外，在这样一个简单的例子中，仅利用其中任何一次裂解出的两个肽段，均可求出该肽的序列。这是因为 CNBr 和 Tryp 均分别从 Met 和 Lys 的羧基侧裂解肽链。

有些蛋白质除氨基酸外，还会有其他化合物。这些蛋白质被称为结合蛋白质而其非氨基酸部分则被称为辅基（见第 8 章）；其蛋白质部分称为脱辅基蛋白。糖蛋白（见第 6 章）及蛋白聚糖（见第 5 章）均含有共价结合的糖，而脂蛋白（见第 6 章）则将脂类作为辅基。

分子质量测定

每一种蛋白质均有特定的分子质量。而且，在特定条件下，利用某一蛋白质的大小或分子质量，可将它与其他蛋白质区别开来，注意：分子质量（或更确切地说，是相对分子质量），M_r，是没有单位的，它代表相当于^{12}C 的一个原子质量 1/12 的分子质量。另一方面，分子质量，通常以道尔顿（Da）或千道尔顿（kDa）作为单位来表示，而 1Da 等于一个^{12}C 原子质量的 1/12（即 1.66×10^{-24}g）。摩尔质量是用克来表示的 1 摩尔物质的质量。分子质量与摩尔质量数值相同，但单位不同。例如血清白蛋白的相对分子质量为 66 000，分子质量是 66kDa，而摩尔质量是 66 $kgmol^{-1}$。

蛋白质的分子质量由所组成的氨基酸顺序，及其他翻译后修饰作用，如糖基化，一些非肽基团，如金属和辅因子的连接等共同决定。若从所组成的氨基酸顺序中即可精确计算出该多肽链的分子质量，则可根据绝大多数蛋白质中氨基酸组成比例推导出的一个经验公式，用该多肽的氨基酸残基数乘以 110 即可求出该多肽的相对分子质量。

例 4.6

人类的细胞色素 c 含有 104 个氨基酸残基。其相对分子质量大约是多少？

细胞色素 c 的相对分子质量大约为 11900，这是因为其多肽链的相对分子质量（约 104 ×110）加上血红素辅基的相对分子质量（412），即为其总相对分子质量。相应的，细胞色素 c 的分子质量约为 11.9kDa。

具有四级结构的蛋白质是由几个独立的多肽链通过彼此间非共价相互作用而组成的。当在解聚条件下（如用 8 mol/L 尿素减弱其氢键和疏水相互作用，巯基乙醇来破坏其二硫键）测定这类蛋白质的分子质量时，即可测出各组成多肽链的分子质量。将这些结果与蛋白质的总分子质量进行比较，就可得知该蛋白质是由几条多肽链组成的。

可用热动力学方法来测定蛋白质的分子质量。这些方法有渗透压测定法，超速离心沉降分析法等。渗透压对溶液中分子的数量非常敏感，若已知溶液中蛋白质的总质量，则可计算出该蛋白质的摩尔质量。蛋白质分子在离心时的沉降率直接与其分子质量相关。

通过与已知分子质量的一系列标准品比较，也可利用凝胶过滤法或测定蛋白质在电泳凝胶（凝胶电泳法）中的迁移率来估测蛋白质的分子质量。质谱法则是一种绝对而非常精确地测定蛋白质分子质量的方法。

沉降分析法

根据 Svedberg 公式，可通过测定沉降系数 S 及扩散系数 D（参见问题 4.18）来计算溶质的相对分子质量（M_r）：

$$M_r = \frac{RTS}{D(1-\bar{v}\rho)} \tag{4.1}$$

其中 R 代表气体常数，T 为绝对温度，$\bar{v}$ 为该溶质的部分特异性体积（即其密度的互补值）。ρ 为溶液密度。沉降系数 S，由溶质的摩尔质量及分子的大小，形状决定，可通过溶质超速离心时在重力场中的沉降率来测定。扩散系数 D，由溶质分子的大小，形状决定，可通过溶液与纯溶剂交界的溶质扩散率来测定。

沉降系数常用 Svedberg 单位：S 来作为单位，它是以超速离心的发明者 Svedberg 的名字来命名的，$1S=10^{-13}$秒。下表列出了一些蛋白质的沉降系数。

蛋白质	相对分子质量	沉降系数
溶菌酶	14 000	1.9 S
血红蛋白	64 500	4.5 S
过氧化氢酶	248 000	11.3 S
脲酶	480 000	18.6 S

凝胶过滤

随着相对分子质量的减少，球蛋白从凝胶过滤柱中被洗脱所需的溶液体积也相应减少。因此，通过与一系列已知相对分子质量的标准品的洗脱体积进行比较，即可在其中估计出一未知蛋白质的分子质量（图 4－2）。

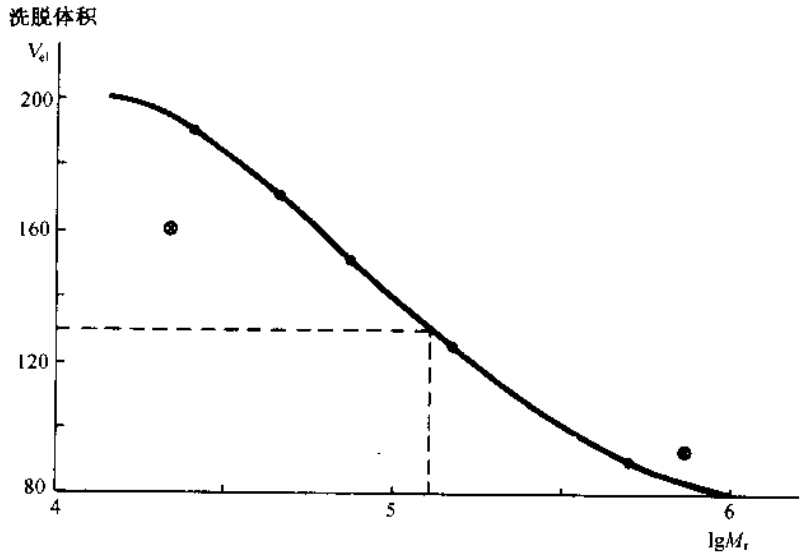


图 4－2 蛋白质的凝胶过滤曲线。用 Sephadex G－200 柱过滤的一组蛋白质的洗脱体积对应其相对分子质量作图。在画此校准曲线时没有使用两个标有⊗的数据点

蛋白质	相对分子质量	洗脱体积/ml
蓝色葡聚糖*	10^6	85
溶菌酶	14 000	200
胰凝乳蛋白酶原	25 000	190
卵清蛋白	45 000	170
血清白蛋白	65 000	150
醛缩酶	150 000	125
脲酶	500 000	90
铁蛋白†	700 000	92
卵类黏蛋白	28 000	160
未知样点	—	130

* 蓝色葡聚糖是与染料分子共价连接的一种高分子质量的碳水化合物。
† 不用于校准曲线。

例 4.7

利用凝胶过滤法将一组标准蛋白质与一个未知酶样品过 Sephadex G－200 柱。每种蛋白质的洗脱体积 V_{el}如上表所示。求

(a) 以 lgM_r为横坐标，洗脱体积 V_{el}为纵坐标，将表中数据绘图表示出来。

(b) 由标准品各点所得出的最适曲线中，求未知酶样品的分子质量。

(c) 解释铁蛋白和卵类黏蛋白的洗脱行为异常的原因。

答：(a) 图 4－2 是利用表中数据所作的最适曲线以及未知样品在图中的相关位置。

(b) 从图 4－2 可知，未知酶的 $M_r \simeq 126\ 000$。

(c) 铁蛋白含有一个氢氧化铁核心，故其密度要高于其他标准品。卵类黏蛋白是一种密度不同的糖蛋白，故其形状亦不同于其他标准品。

凝胶电泳

在有去垢剂十二烷基磺酸钠（SDS）存在时，许多蛋白质构象均松散解聚。当用一定体积溶液进行洗脱后，经 SDS 变性的多肽链分子的电泳迁移率只随分子质量增大而下降，故可以一系列标准蛋白质的迁移率中求出未知蛋白质的分子质量。

问题：以上两种测定蛋白质分子质量的方法中，其本质依据是什么？

1. 在这两种测定方法中，蛋白质分子的流体动力学行为均依赖于分子的形状。故必须假定未知蛋白质的分子形状（即球形、椭圆形等）与标准品的分子形状一致。
2. 凝胶过滤行为实质上依赖于所测分子的有效大小，而不是质量。所以若所测蛋白质与标准品密度不同，则所测分子质量就会出现错误。
3. 凝胶电泳时 SDS 与蛋白质结合，应首先假定对于所有蛋白质来说，每克蛋白质所结合的 SDS 量是相同的。每摩尔蛋白质所结合的 SDS 量不同使得不同蛋白质所带总电荷量不同，使得其在电泳中的迁移率不同，故据此所得的分子质量可能是错误的。

质谱法

以前将质谱法用于生物大分子的分子质量测定时受到了方法学上的限制。即气化样品没有一种方法能保证样品不发生热分解。近些年来，随着技术的进步，这些问题已被解决，故质谱测定法在大多数生化实验室中已成为一种常规测定工具。目前用于进行样品处理的方法有：基质协助激光解吸附法（MALDI），该方法是将样品用一种低分子质量的有机基质进行包埋，然后用一种脉冲 UV 激光进行照射；电离喷雾法，该方法是将蛋白质的稀酸溶液从一个带正电荷的针状电极上喷入一真空室中（在真空室中蛋白质样品表面的溶液被迅速蒸发而剩下了裸露的带有大量正电荷蛋白质分子）；以及原浆解吸附法，该方法是用高能带电粒子将蛋白质样品从一金属支持物上释放出来（带正电荷的粒子通过电场被加速然后再通过磁场而发生偏转，由于具有不同的荷-质比，带电粒子发生分离）。

质谱法的精确度可达 0.01%，仅需几皮摩样品，并可用于测定从单一氨基酸直到超过 100kDa 的蛋白质的分子质量。

4.3　蛋白质折叠

蛋白质通常都折叠成结构紧密的，具有严格定义的三维空间构象

为了理解蛋白质的功能，我们需要了解多肽链所采取的空间折叠方式或称为构象的一些知识。虽然许多人工合成的多聚氨基酸，并不具有严格意义上的构象，且在溶液中好像以无规则卷曲的形式存在，但绝大多数天然蛋白质均具有严格定义的折叠构象。有些蛋白质，如毛发中的角蛋白，呈纤维状，并具有由规则的，重复折叠方式而形成的线性或片层状结构。其他蛋白质，例如大多数酶，被折叠成紧密的，几乎呈球形的球状构象。

问题：为什么蛋白质会发生折叠？

蛋白质折叠成紧密的结构可伴随构象熵（紊乱度）的大幅度降低，这在热力学上是不稳定的。天然折叠构象的维持是靠大量弱的，非共价相互作用力来维持的，这些作用力可弥补折叠构象造成的不利的熵减少。这些非共价相互作用包括氢键、离子键、疏水相互作用及范德华力。这些相互作用可保证折叠状的蛋白质比未折叠时更稳定（通常仅是稍微稳定一点）。

离子键

根据库仑（Coulomb）定律带电粒子彼此间相互作用时：

$$\Delta E = \frac{Z_A Z_B \varepsilon^2}{D r_{AB}} \tag{4.2}$$

公式中$\triangle E$代表离子键的能量，Z_A与Z_B指相互作用的两个离子所带的电荷数，r_{AB}是两个相互作用离子间的距离，ε为一个电子的电荷数，D为介质的介电常数。当两个离子所带电荷数相反时，二者间距离缩短（彼此靠近）则离子键能$\triangle E$下降，故离子键易形成。

因此蛋白质中带负电荷的部分（如Asp和Glu残基的羧基侧链）经常与Lys、Arg或His残基带正电荷的侧链形成离子键。这些离子键还常形成盐键，在盐键中除电荷间的相互吸引外，还包括某种程度的氢键形成，如图4-3所示。

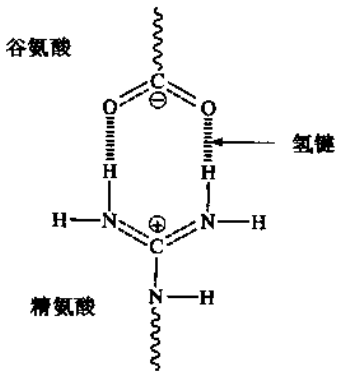


图4-3 在Arg与Glu残基间形成的盐键

由于水的介电常数高达80，蛋白质表面残基间离子对形成的离子键能量较低，范围在0.5～1.5kJmol^{-1}之间。而埋藏在蛋白质内部的残基，由于介质的介电常数较低，故它们之间形成的离子键能高达15kJmol^{-1}。

范德华力

所有原子和分子都通过瞬时，偶极-偶极间相互作用而彼此吸引。分子并不需要带净电荷才能参与这种偶极相互作用；如果参与偶极相互作用的原子具有不同的电负性，则原子间的电子密度会高度不对称。

带有最大电负性的原子“过剩”负电荷最多：蛋白质中原子的电负性分别是：O，3.44；N，3.04；C，2.55；以及H，2.20（范围从0.8～4）。

这些瞬时偶极相互作用被称为范德华力（van der Waals interaction）。这是很弱的近距离相互作用，而且随原子间距离六次方的倒数而变化。当受范德华力作用的两个原子靠得太近

时，两者之间则会产生强烈的排斥力。因此，范德华力能量（E_{vdw}）可用以下公式表示：

$$E_{vdw} = \frac{a}{d^{12}} - \frac{b}{d^{6}} \tag{4.3}$$

这里 d 代表相互作用原子间的距离，a 和 b 为正常数。公式中第一项和第二项分别代表范德华力中相斥力和吸引力这两种作用力成分。公式（4.3）经常被称为 Lennard-Jones 6，12 电势。

范德华力的理想作用距离是相互作用的原子间距离大于彼此范德华半径（指晶体中所看到的两原子间最小的接触距离）之和，即 0.3～0.5Å。范德华力的能量是相当弱的，通常小于 1 kJ mol^{-1}。

氢键

氢键的产生是因为与一个电负性原子（如 O、N 或 S）共价结合的氢原子跟另一个具有孤对电子的电负性原子间产生的静电吸引作用所致。

—O—H———O═C

供体　　受体

虽然氢原子形式上是与供体基团（原子）相连，但实际上氢原子是受到供体和受体原子共同作用的。氢键具有高度方向性且只有当参与形成氢键的三个原子位于一条直线时，作用力最强。蛋白质分子上大多数的氢键是在主链上 C═O 与 N—H 基团间形成的，其 H···O 间距离为 1.9～2.0Å。据估计，在水溶液中，这种类型的氢键对于稳定蛋白质的构象所提供的能量约为 5 kJ mol^{-1}（范围从 2 kJ mol^{-1}到 7.5 kJ mol^{-1}，参见表 4.1）。

表 4.1　蛋白质构象的非共价作用力类型

作用力类型	举例	键能/（kJ mol^{-1}）*
范德华力	C—H···H—C	0.4～2.0
离子键	—COO^-···H_3N^+—	0.5～15
氢键	—N—H···O═C—	2.0～7.5
疏水相互作用+	埋藏在分子内部的—CH_2—	～3

* 键能是指破坏该相互作用所需的能量。

\+ 该值代表蛋白质分子的一个非极性侧链上的一个—CH_2—基团以分子内部转移入水所需的自由能。

疏水相互作用

当疏水基团进入水中时将使其周围的水分子排列成能量高而不稳定的有序结构，即使溶液熵减少。因此将非极性基团从水中转移到一个非极性环境中将伴随着水的熵增加，且为自发过程（参见第 10 章）。蛋白质多肽链折叠成紧密的球形构象即可使非极性基团不再与水直接接触；该过程中释出水分子所致的熵增加可补偿多肽链折叠所致的熵减少。将一个亚甲基（—CH_2—）基团埋藏入蛋白质分子内部所产生的构象稳定作用力与氢键一样强（约为 3 kJ mol^{-1}）。

疏水相互作用是水溶性球蛋白分子折叠的重要驱动力，故我们可得出如下规律：疏水残基总是倾向于埋藏在蛋白质分子内部以最大限度地减少与周围水分子的接触。

例 4.8

如果一个特定蛋白质分子总的折叠能量仅为 40 kJ mol^{-1}，为破坏它的结构，必须要断裂多少个氢键？

由于每个氢键稳定蛋白质构象的能量约为 5 kJ mol^{-1}，故断裂 8 个这样的氢键就足以破

坏此蛋白质的天然构象。

蛋白质的变性

由于大多数蛋白质中稳定其构象的能量是非常小的，故即使在常温下许多蛋白质的构象都会发生轻微而快速的变动。另外，使蛋白质分子构象松散，或称为变性（denature）是很容易的。

常用的变性条件有：

(a) 高温

(b) 极端 pH 值

(c) 高浓度的脲或盐酸胍类化合物：

脲　　盐酸胍

(d) 去垢剂如十二烷基磺酸钠，$CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3^-Na^+$。

蛋白质结构由氨基酸序列决定

有些蛋白质和酶，用尿素完全变性并还原其二硫键后，在去除尿素后，还能自发折叠成原来的活性天然构象。这一现象证明使蛋白质构象正确折叠的信息存在于其构成氨基酸的序列中。

例 4.9

水解核酸的核糖核酸酶（见第 7 章），含有稳定其构象的四个二硫键。用 6 mol/L 盐酸胍来减弱其氢键和疏水相互作用，并用 1 mmol/L 巯基乙醇来还原二硫键，则酶的活性完全丧失，且二级结构也完全消失。用透析或凝胶过滤法除去盐酸胍后，酶活性恢复，天然构象又可形成，且可再次形成正确的二硫键。

许多较大的蛋白质需要分子伴侣（其本身亦为蛋白质分子）协助来折叠成正确的构象。据认为这些分子伴侣通过识别蛋白质错误折叠的中间体，并使其解链松散而有再次折叠成正确构象的机会。

4.4 蛋白质结构

如何描述蛋白质的结构?

完整地描述一个蛋白质分子三维结构的方法是将该蛋白质置于 Cartesion 坐标系并列出每一个原子的坐标值（x，y，z）。事实上，这种方法正是美国 Brookhaven 国家实验室的蛋白质数据库中经实验所测定的蛋白质结构的贮存形式。然而，蛋白质的结构可以更简便地用其中每一个键的旋转角度（或扭转角度）来进行描述（图 4-4）。例如，一个氨基酸残基的主链构象可以由给出的旋转角 Φ（绕 N—C_α 键旋转）、Ψ（绕 C_α—C′键旋转）和 ω（绕 N—C′键旋转）进行定义。当—N—H 基团与 C_α—C′键呈反式时，Φ 为零位；而当 C_α—N 键与 —C═O 键呈反式时，Ψ 角为零位（图 4-4）。肽键的扭转角（ω）总是 180°（见例题 4.10）。要想全面描述蛋白质分子的立体结构还需要了解其侧链 χ 的扭转角度。

例 4.10

为什么肽键为平面构象?

由于肽键具有如下式所示的两种共振平衡形式，故 C—N 键具有部分双键性质：

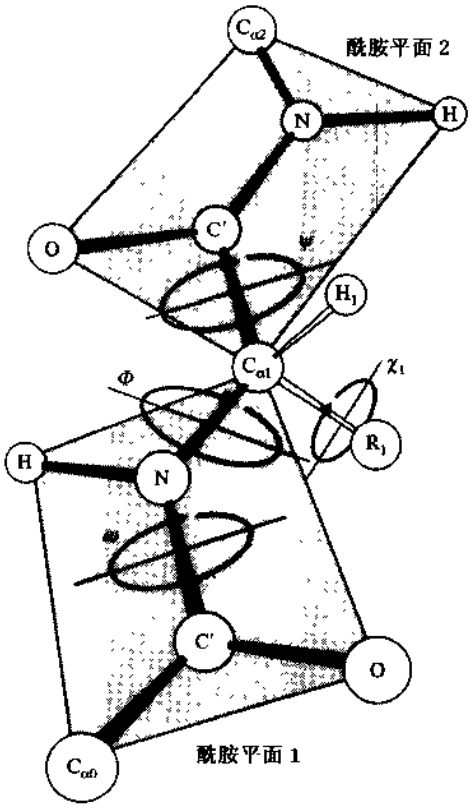
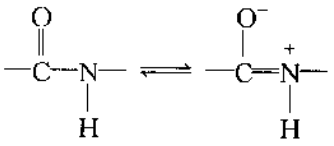


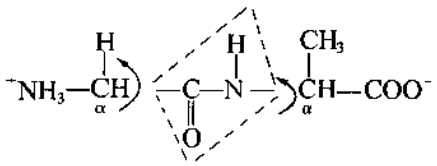
图 4-4　蛋白质的旋转角 ω、Φ、Ψ 和 χ。
图示当 ω、Φ 和 Ψ 均为 180°时的构象



C—N 键长（0.132 nm）介于 C—N 单键长（0.149 nm）与 C═N 双键长（0.129 nm）之间。C—N 键的部分双键性质限制了它的自由旋转，使得肽键的四个原子 O，C，N 与 H 均位于同一个平面内，其中 O 原子与 H 原子呈反式构象；使得旋转角 $\omega = 180°$。顺式构象仅见于 X-Pro 所形成的肽键中，其 ω 相应为 0°。

例 4.11

在二肽甘氨酰丙氨酸中，主链上哪个键允许所连接基团自由旋转？



甘氨酰丙氨酸

在以上结构式中，用虚线圈起来的部分即为肽键。

由于肽键本身为一刚性结构平面，故围绕羰基碳原子与氮原子之间形成的键（即 C′—N 键）是不能自由旋转的。但围绕 α 碳原子与羰基碳原子（C_α—C′ 键）及围绕氮原子与丙氨酸的 α 碳原子（N—C_α 键）所形成的两个键均可自由旋转。因此，对于蛋白质中的每一个肽键来说，均有两个可自由旋转的键，这两个键所形成的相对角度确定了该蛋白质的特定主链构象。

问题：蛋白质分子的结构形成有何限制条件？

并不是任何 Φ 角和 Ψ 角的组合都是可行的，这是由于有许多 Φ 角和 Ψ 角的组合会使相邻残基间的原子发生碰撞。对于除 Gly 之外的所有残基，这类涉及到侧链原子的空间位阻的存在使得蛋白质分子可能存在的构象数量急剧减少。不会引起相邻原子发生碰撞的可能的 Φ 角与 Ψ 角的组合可用构象图来表示（也称之为 Ramachanclran 构象图，是以在这方面做了大量探索性工作的一位化学家的名字来命名的）。图 4－5 即为用拉氏作图法所示丙氨酰丙氨酸可能存在的构象。

其中双斜线区代表不存在位阻的构象（即 Φ 与 Ψ 的组合）。单斜线区代表有某种位阻存在的构象，但如果蛋白质中存在其他相互作用力可抵消这种位阻的影响，则这些构象也是可以形成的。

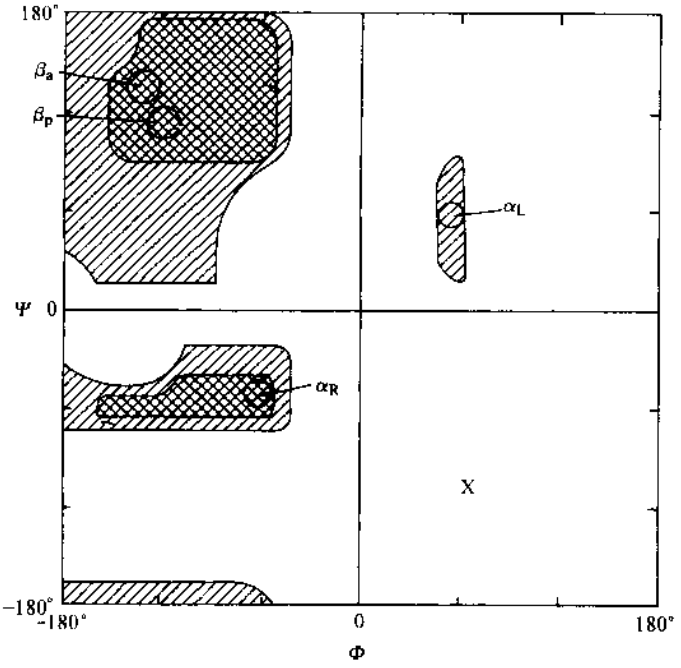


图 4－5 丙氨酰丙氨酸的拉氏构象图，用双斜线表示 Φ 和 Ψ 角组合的完全允许区域而用单斜线表示部分允许区域（图 4－4）。在坐标图中用 β_p 和 β_a 分别表示平行与反平行 β－折叠构象，用 α_L 和 α_R 分别表示左手与右手 α－螺旋构象

例 4.12

右手 α－螺旋的 Φ 值与 Ψ 值分别为 $-57°$ 和 $-47°$。你认为该 α－螺旋构象是一种稳定构象吗？

答：是稳定构象。因为该右手 α－螺旋的 Φ 与 Ψ 值均位于拉氏构象图中结构特别合理的区域，即在图 4－5 中用符号 α_R 所示的区域。

蛋白质构象中常包含有规则地重复性结构

如果多肽链中每个相邻氨基酸残基间的主链旋转角度保持不变，则多肽链会形成一个规则地重复构象。这些规则的重复构象从数学角度来考虑的话，可认为均属螺旋结构，根据这些结构外表的特征，常被分别称为 α－螺旋与 β－折叠片层。

天然存在的规则重复多肽构象仅有两种类型可完全满足下列条件；具有正常的原子间范德华半径，特定的键角，以及肽键为平面结构，且不存在破坏构象的因素并保证最大限度地形成氢键，它们是：

1.α-螺旋，例如在α-角蛋白中发现的螺旋结构

2.β-折叠片层（平行或反平行），例如拉伸的角蛋白和丝心蛋白中的β-折叠。

这些规则重复结构也作为球蛋白的基本折叠模式以及纤维蛋白的主要构象而存在。对于许多球形蛋白质分子来说，多肽链结构的一个显著特性是折叠的无规律性。这些区域通常会有一些称之为回折的短片段，它们可将两股β-折叠链连接起来。那些不存在规则重复的二级结构的区域则常被称为无规则卷曲构象。然而，这些区域还可被更确切地命名，也就是说，虽然这些构象是无规则的，但称之为无规则区域似乎更为合理。

α-螺旋

在α-螺旋结构中，多肽链主链的折叠构象使每个氨基酸残基上的 —C═O 基与它后面的第四个残基上的 —N—H 基均可形成氢键，即主链第一个残基上的 —C═O 基与第五个第残基上的 —N—H 基间成键，其他从此类推。

问题：α-螺旋中主链第1至4位残基上的 —N—H 基也能与其他残基上的 —C═O 基形成氢键吗？

多肽链中不存在与这几个酰胺基反应的相应 —C═O 基团。故这四个酰胺基不能形成氢键。与此相似，在多肽链的另一端，四个 —C═O 基因亦不能形成相应氢键。若多肽链很长，其末端残基不能形成氢键对于整条肽链构象的稳定影响不大。而由于末端效应对于短肽链构象的稳定更重要，则这种影响使得较短肽链更不稳定。

如图4-6所示，α-螺旋的主链围绕长轴螺旋上升。所有的氢键取向基本与该轴平行，侧链则向外伸展。每个残基沿长轴彼此相距0.15 nm，每圈螺旋包括3.6个残基。虽然左手

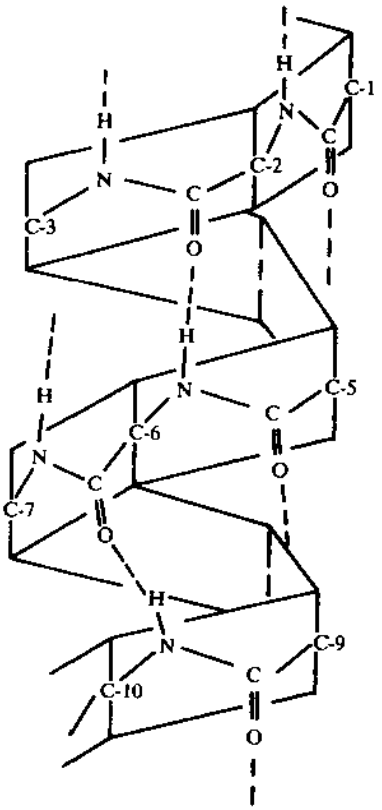


图4-6　示右手α-螺旋。在图中每个该平面片段表示一个肽键（肽平面），其中α-碳原子位于相邻平面的连接处

螺旋和右手螺旋均可形成，但对于 L-氨基酸来说，形成右手螺旋在能量上是有利的。

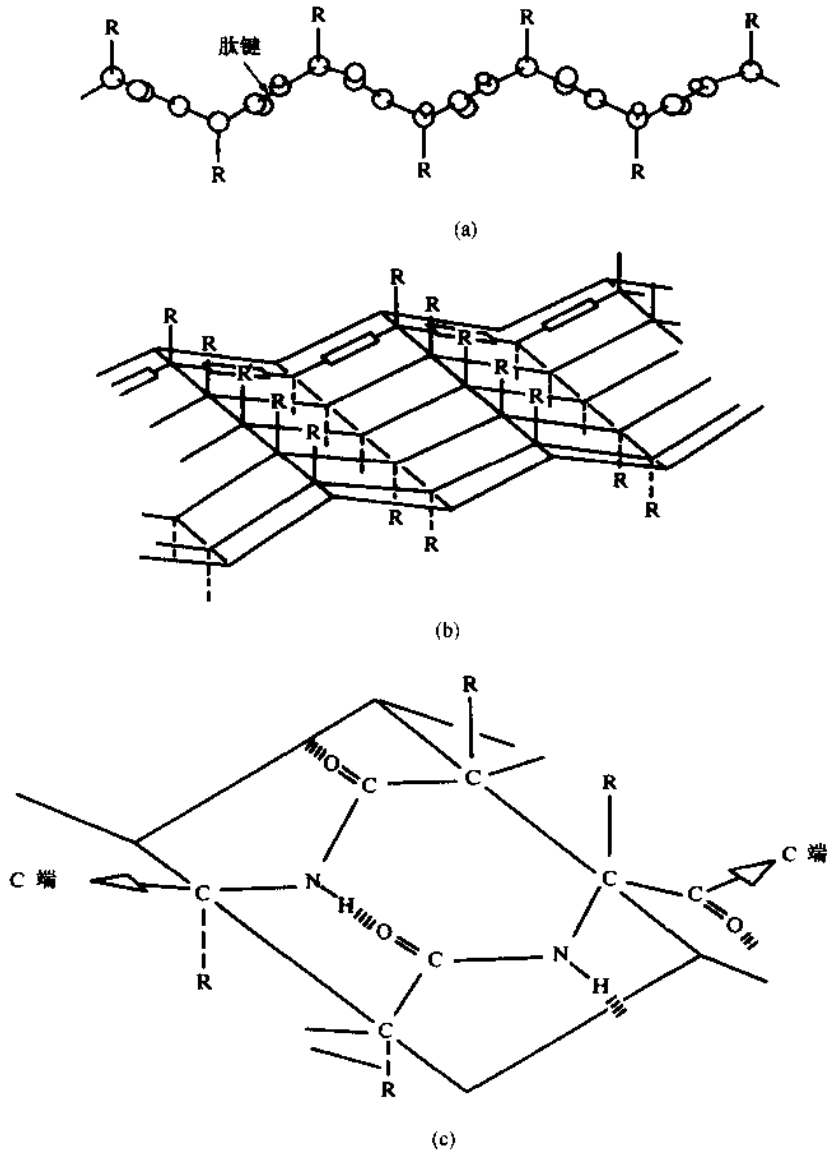
由于多肽链中每个 —C═O 与 —N--H 均可形成氢键（除了两端的四个残基之外），故 α-螺旋构象是非常稳定的。然而对于某些氨基酸来说，由于其侧链之间的相互作用可以降低 α-螺旋的稳定性，故多肽链的 α-螺旋构象中这类破坏螺旋稳定性的氨基酸所占比例较少（参见表 4.2）。

表 4.2 倾向形成 α-螺旋的氨基酸残基

螺旋形成者	Glu、Ala、Leu、His、Met、Gln、Trp、Val、Phe、Lys、Ile
螺旋破坏者	Pro、Gly、Tyr、Asn
中间类型残基	Asp、Thr、Ser、Arg、Cys

β-折叠片层结构

第二类具有规则、重复构象的主要类型是 β-折叠片层结构，其不同于 α-螺旋之处在于



(a)

(b)

(c)

图 4-7 β-折叠片层结构：(a) 伸展的 β-折叠构象中的一条多肽链片段；(b) 伸展的 β-折叠多肽链被此并排相连形成片层结构；(c) 反平行 β-折叠片层中相邻多肽链间形成氢键的详细图解

这种构象的多肽链是几乎完全伸展的，如图 4－7（a）所示，且氢键是在相邻肽链间形成的而不是在单一肽链内部形式的，如图 4－7（c）所示。

相邻肽链同向排列时（即均为 N 端到 C 端的走向）称之为平行 β-折叠，如相邻肽链反向排列时，则称为反平行 β-折叠，如图 4－7（c）所示。这些结构经常形成伸展的片层构象，如图 4－7（b）所示。有时几条 β-折叠肽链有可能一条挨一条地排列在一起，形成片层结构。这是因为在这种片层结构中相邻肽链中氨基酸残基的侧链交替地上下分布在片层结构的两侧，如图 4－7（b）所示，侧链相对较小的氨基酸，如 Ala 和 Gly 易形成 β-折叠片层结构。若氨基酸残基的侧链较大，则在蛋白质多肽链的许多部分间都会产物空间位阻，影响构象的稳定性。

例 4.13

下列两个多肽最可能形成的规则、重复结构分别是什么？

（a）多肽（Gly-Ala-Gly-Thr）；（b）多肽（Glu-Ala-Leu-His）。

多肽（a）的大部分氨基酸残基侧链较小。除 Ala 外，其他残基均无形成螺旋构象的趋势，且 Gly 为 α-螺旋的破坏者，故该多肽易形成 β-折叠构象。

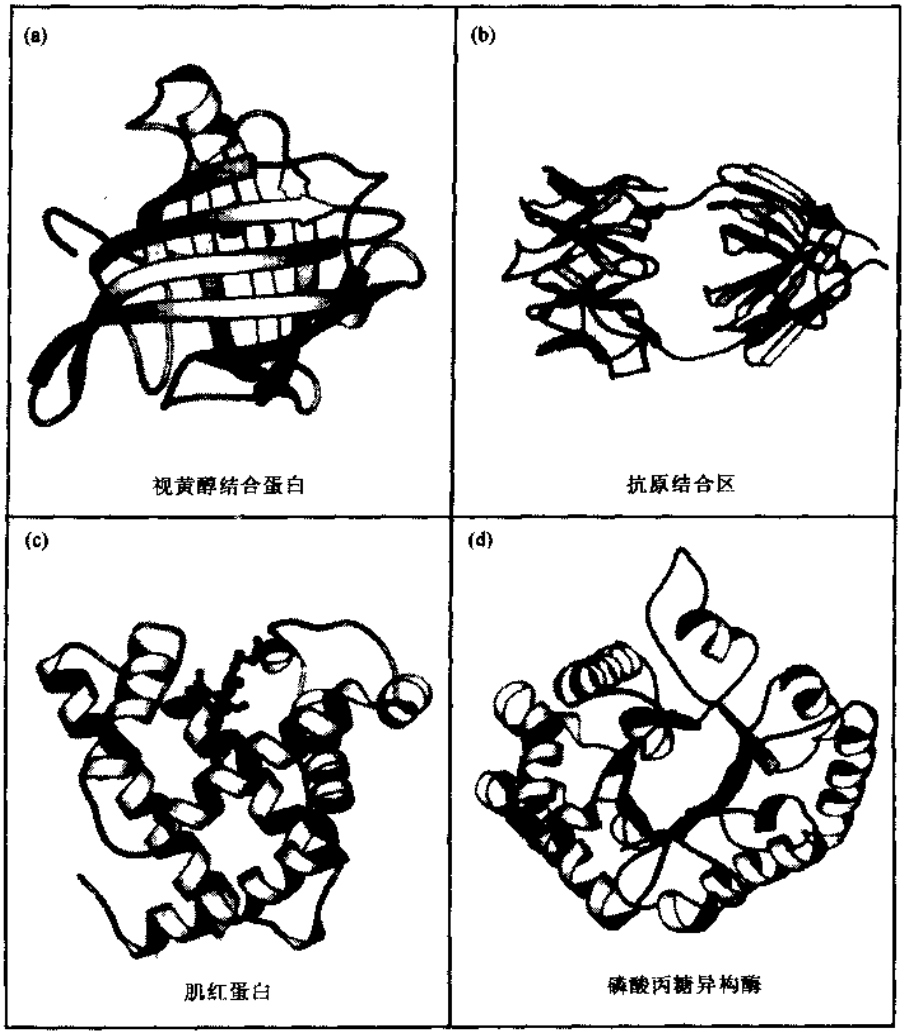


图 4－8　蛋白质结构的典型代表。其中螺旋状条带用来代表 α-螺旋结构，N→C 端方向的箭头带用来代表 β-折叠结构。β 蛋白主要含 β-折叠结构（例如视黄醇结合蛋白和抗体的抗原结合区），而 α 蛋白则主要由 α-螺旋构成（例如肌红蛋白）。α/β 蛋白则既含 α-螺旋又含 β-折叠结构（例如磷酸丙糖异构酶）

多肽（b）是由许多侧链较大的氨基酸残基组成，这些氨基酸均使β-折叠结构不易稳定。相反，这些氨基酸都是螺旋结构的稳定者，故多肽（b）更易形成α-螺旋。

例 4.14

许多球蛋白结构都由α-螺旋，β-折叠及无规则区域共同组成。在图 4-8 中用一些典型的图像符号来表示这些结构在球蛋白中的组合形成，其中螺旋状条带用来代表α-螺旋结构，N→C 端方向的箭头用来表示β-折叠结构。平行β-折叠层的箭头方向一致；而反平行β-折叠的箭头方向交替反向。β蛋白（如视黄醇结合蛋白以及抗原结合区）的二级结构中β-折叠为主要成分，而α/β蛋白（如肌红蛋白）则主要由α-螺旋组成。α/β蛋白（如磷酸丙糖异构酶）则由α-螺旋与β-折叠混合构成（图 4-8）。

三股胶原螺旋

来源于皮肤和肌腱的胶原蛋白，其氨基酸组成中 Pro 与羟-Pro 大约占 30%，Gly 占 30%。这种蛋白质有一个特殊的三股链结构，其中每一股链的结构都与多聚脯氨酸链相似，它们彼此扭曲盘绕形成一个三股螺旋构象。这三股链彼此间可形成链间氢键，这些氢键是在 Gly 残基的—NH 与其他氨基酸的 —C═O 之间形成的。

问题：为什么在α-螺旋片段中很少发现 Pro?

Pro 的α-氨基为亚氨基。当 Pro 通过其亚氨基与其他氨基酸形成肽键后，则没有多余的酰胺氢原子来形成氢键以稳定α-螺旋构象。此外，由于 Pro 的侧链与其α-氨基结合在一起，故其 N—C_α 键不能自由旋转，使得 Pro 不能参与形成正确的α-螺旋构象。

虽然 Pro 不能作为形成α-螺旋的氨基酸残基，但只由 Pro 组成的多肽可形成一种不同类型的螺旋的构象。这种多聚脯氨酸螺旋不是靠形成氢键来稳定构象的，而是靠 Pro 侧链彼此间的空间排斥作用来稳定的。多聚 Pro 螺旋比α-螺旋更加伸展，相邻残基间的轴距为 0.31 nm。

例 4.15

胶原蛋白的多肽链序列大部分都由（Gly-Pro-X）组成，其中 X 代表除 Gly 与 Pro 之外的其他类型氨基酸残基，为何胶原蛋白可形成三股螺旋结构，而多聚脯氨酸则不能？

答：在胶原三股螺旋中，每个排在第三位的残基位置均朝向螺旋的中心且与另外一条链紧密接触。只有 Gly，因其侧链为单个氢原子，故才能适应这种狭小的空间而形成三股螺旋构象。

光学活性（旋光性）

不对称的分子，如碳水化合物，氨基酸以及蛋白质均可使平面偏振光的偏振面发生旋转。旋转的程度依赖于物质的浓度以及通过样品的光径长度（见第 2 章），这一概念在很大程度上与光吸收值相似（见第 3 章）。旋转的程度（事实上，甚至连旋转的方向）还依赖于光的波长。旋光率［α］（每单位浓度物质及光径长下测得的偏振面旋转程度）随平面偏振光的波长不同而改变的现象称为旋光色散（ORD）。

蛋白质的构象作为分子不对称性的另一个来源，影响了 ORD 的光谱范围。可溶性蛋白质构象中的螺旋区域可使 ORD 光谱图中出现一个特异的正峰（图 4-9），这一点无规则区的图形截然不同。

通过将未知蛋白质的 ORD 光谱图与适当的已知构象的标准品蛋白质进行比较，就可计算出该蛋白质中各种构象的大概组成比例。

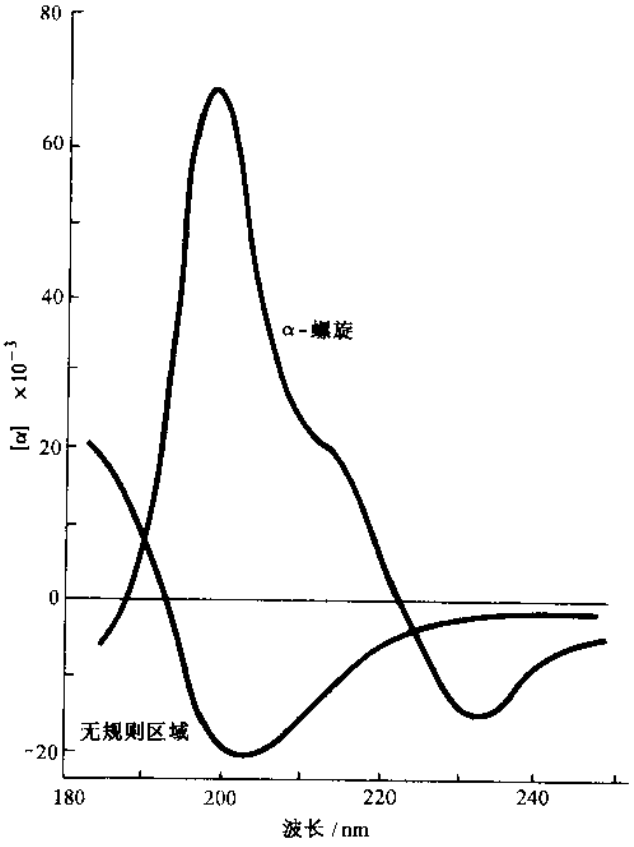


图 4-9　多聚 D-赖氨酸的 ORD 光谱，示 α-螺旋与无规则构象的光谱图形。[α] 的单位是（°ml dm^{-1}g^{-1}）

蛋白质结构层次

荷兰蛋白质化学家 Kai Linderstrøm-Lang 最先提出蛋白质分子构象有不同的结构层次：

(a) 一级结构：指其氨基酸的组成序列。

(b) 二级结构：规则，重复的折叠形式（如 α-螺旋与 β-折叠片层结构），该构象的稳定是通过在氨基酸序列上彼此相近的肽链内或肽链间形成氢键来维持的。一种蛋白质中二级结构的组成形式通常可用一个拓扑图来代表（图 4-10），在该图中用平面图形来表示这些二级结构的组成范围和相对伸展方向。这些拓扑图形常用来表示蛋白质家族内的结构关系。

(c) 超二级结构：在许多蛋白质中都可见到二级结构的共同重复形式。其中一种常见的重复形式是 β-α-β 模式，该模式包括二个 β-折叠片层结构，中间由一个 α-螺旋隔开，第二个 β-折叠片层与第一个 β-折叠片层结构间形成氢键（图 4-11）。其他的模式还包括：β-发卡，是两个反平行 β-折叠股中间用一个小的回折段紧密地连接在一起；αα 模式，由两个相邻的折叠起来的反平行 α-螺旋所组成；β-折叠筒，由一些伸展的 β-折叠片卷起来形成一个连续的圆柱体。

(d) 三级结构：对于球蛋白来说，三级结构可被认为是不同的二级结构区域在三维空间上的折叠组合，其中在一级结构上相距很远的部分可以在三级结构上聚在一起形成相互作用来稳定构象。对于那些很少或几乎不含可测到的 α-螺旋或β-折叠结构的蛋白质来说，三级结构可被认为是蛋白质在三维空间的折叠形式，它通过远距离序

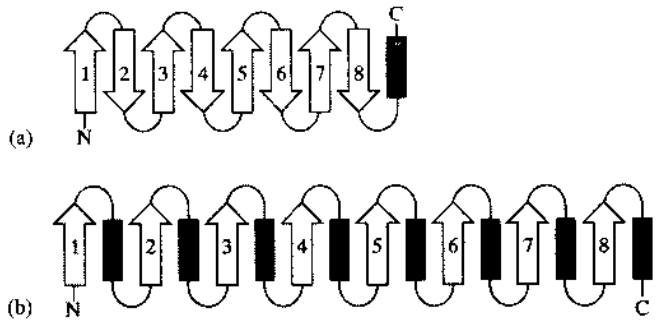


图 4－10　视黄醇结合蛋白（RBP）与（a）磷酸丙糖异构酶（TPI）（b）的二级结构拓扑图。其中白色箭头代表 β－折叠肽段（数字表示从 N 端到 C 段的顺序号）黑框代表 α－螺旋段。注意从图 4－8 中可看到这两种蛋白质均由 8 条 β－折叠肽段围成一个桶形并且第一条链与最后一条链之间形成氢键而使桶闭合。而其中 RBP 中的 β－折叠均为反平行结构，TPI 中的则为平行 β－折叠，外由一层 α－螺旋所环绕，这样使得桶内每一段平行 β－折叠结构均可与相邻 β－折叠段连接

列间的相互作用来稳定构象。

(e) *结构域*：是许多球蛋白所具有的共同结构特征，特别是对于分子质量超过 20kDa 的那些大分子。较大的蛋白质常折叠成 n 个结构域以便每个结构域的分子质量保持在 17kDa 左右。例如三磷酸甘油醛脱氢酶的酶分子折叠成两个结构域，这样使得两个结构域都有各自独立的功能：一个分子质量约为 16kDa 的结构域与辅酶 NAD^+ 连接；而另外一个约 21kDa 的催化结构域，与底物三磷酸甘油醛相连（见第 11 章）。

(f) *四级结构*：是指不同多肽链之间通过相互作用以形成一个寡聚体结构，通过链间非

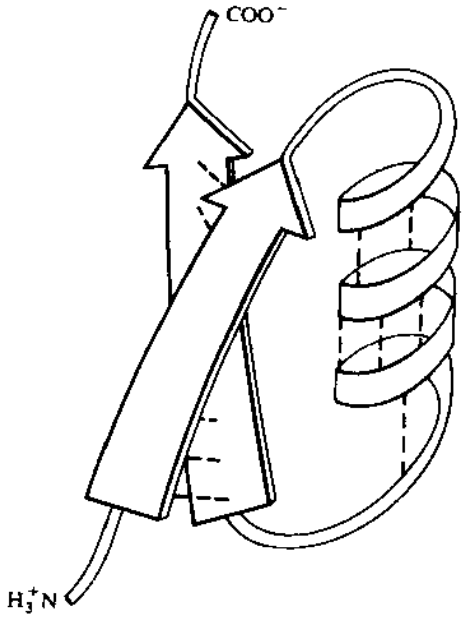


图 4－11　蛋白质的 β－α－β 型的超二级结构单位。其中 β－片层用箭头来表示，α－螺旋片段则用螺旋圈来表示。用虚线来表示氢键形成的大致部位

共价键来稳定四级结构。

蛋白质结构家族

到目前为止，许多球蛋白的结构已经通过实验进行了测定，因此就有可能将这些结构进行归类，或将结构相似的结构域进行归类。α/β 家族（包括全部糖酵解过程的酶）包含重复的 β－α－β 模式，而 α＋β 家族包含彼此不相关的 β-折叠片层与 α-螺旋结构。α 家族和 β 家族则分别包含大量的 α-螺旋和 β-片层结构。绝大多数的蛋白质类毒素都属于小二硫键蛋白质家族，其结构特点是由相对数量较多的二硫键来维持一个小的疏水核心的形成；例如昆虫和蝎类的毒素仅由 38～40 个氨基酸残基组成，但它们含有 3 个二硫键。

例 4.16

对于一个球蛋白来说，(a) 其体积和 (b) 表面积与分子质量的关系分别是什么？

(a) 假定该球蛋白密度均一，则其体积 V 直接与分子质量成正比，即 $V \propto M_r$。

(b) 球体的表面积与半径的平方成正比，体积则与半径的立方成正比，故 $A \propto V^{2/3}$。

(a) 中已证明 $V \propto M_r$；故 $A \propto M_r^{2/3}$。

上面的计算结果说明随着分子质量的增加球蛋白的体积要比表面积增加的快。故为使球蛋白中所有带电基团均位于其表面而所有非极性基团均埋在分子内部，有以下三种方法：

1. 较大的蛋白质氨基酸组成可发生变化，即增加非极性侧链氨基酸的组成比例，这样可使分子内部体积增大。
2. 较大的蛋白质分子可折叠成几个独立的结构域，这样每个结构域都是一个球形结构单元，具有自己的内部结构和表面积，这些结构域之间由一段主链相连。
3. 较大的蛋白质可折叠成更长一些或称为杆状的分子。

4.5 序列同源性与蛋白质进化

肌红蛋白作为肌肉中氧分子的携带者而起作用。它是第一个利用 X 射线晶体衍射进行研究的蛋白质，结果发现它是由 8 段 α-螺旋彼此间通过一小段非螺旋区域连接在一起所形成的一个紧密的球形结构。

血红蛋白，是脊椎动物血液中的携氧蛋白质，其结构与肌红蛋白相似。但血红蛋白是由四条肽链组成，即它具有四级结构。四条肽链通过非共价键组合在一起形成一特殊的几何形状。正常成人的血红蛋白有两种主要类型的多肽链：α 链和 β 链。

肌红蛋白的多肽链与血红蛋白的两条链无论在一级结构还是三级结构上都是极其相似的。这两种蛋白质可以说是同源的。肌红蛋白由 153 个残基组成，血红蛋白 α 链由 141 个残基组成，β 链由 146 个残基组成。通过序列分析，发现在人类的这两种蛋白质中，141 个氨基酸残基中只有 24 个不同，且许多还是属于保守性替换。即一条链中的一个氨基酸残基在另一条链中的相应位置上由一个化学结构相似的残基的代替，例如 Glu 用 Asp 代替。

将不同种属动物的血红蛋白和肌红蛋白链的氨基酸序列进行比较发现相关种属的序列具有相似性。随着种系发生差异的增大，不同的氨基酸数量也随之增多。据估计蛋白质以一个恒定的速率进化，两个同源蛋白质间氨基酸组成差异的数量与种系进化中发生歧化的时间成正比。

例 4.17

利用下表所列出的各种细胞色素 c 氨基酸序列组成上的差异，给出人类、家兔、蚕和链孢霉（一种真菌）的进化树。

类别	序列组成上的差异数			
	家兔	蚕	链孢霉	
人类	0	11	36	71
家兔		0	35	70
蚕			0	69
链孢霉				0

这些数据可使我们构建一个进化树，其中分支的长度大约与种属间氨基酸差异的数目成正比（图4-12）。人类和家兔间差异很小，故二者间用短分支线相连。与链孢霉之间的关系相比蚕的细胞色素c结构更接近哺乳类，故它的分支线与哺乳类相连。蚕分支线的长度大约是兔与人分支线长度的三倍。最后，链孢霉与其他三种属的差异数都大致相等。故它的分支线与另三类共同的分歧线相连。

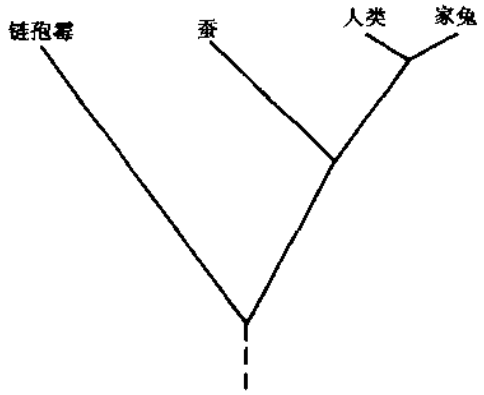


图4-12 由细胞色素c氨基酸序列的差异所构建的种属发生树

4.6 蛋白质构象的测定方法

目前所知的蛋白质结构的知识绝大多数是对蛋白质晶体进行X射线晶体衍的分析以及对蛋白质溶液进行核磁共振光谱测定获得的。这两种技术都有各自的优点和限制，二者对于蛋白质构象的测定具有互补性。1960年肌红蛋白成为第一个通过对其结构进行充分解析来确定其多肽链构象的蛋白质。从那以后，已测定了与数百种不同蛋白质相应的成千上万种结构。现在可通过蛋白质数据库来获取许多蛋白质和核酸结构中原子的坐标值，该数据库可通过互联网进入(其网址为:http://www.pdb.bnl.gov)

问题：从已知的实验测定的蛋白质结构数据库中可得出什么样的蛋白质结构形成的折叠规律?

1. 多数的带电基团都位于分子表面，与水发生相互作用。
   但酶分子中具有催化作用的重要残基则属例外，这些带电残基可与分子内部某一疏水部分发生特异的极性相互作用而得到稳定。
2. 多数非极性基团（如烃基）都位于分子内部，这样可避免与水接触后引起的热力学上的不利影响。但也有例外，即那些能与其他蛋白质或配基结合的特异位点上的非极性基团需位于分子表面才能发挥功能。
3. 分子内部形成近可能多的氢键。
4. 脯氨酸是α-螺旋片段的终结者。

X射线晶体衍射

X射线的波长大约等于1个分子中成键原子间的距离长度（如 C—C 单键长为 1.5Å 而由阴极射线管中铜靶发出的 X 射线波长为 1.54Å）。当一束单色 X 射线与一个分子发生相互作用时可被衍射，且衍射形式可反映出该分子中原子的位置。如果样品是溶液状态，则蛋白质中各个分子将被随机定向而只能获得极少量关于分子整体结构的解析信号。纤维状蛋白和核酸可被 X 射线诱导而定向凝聚成纤维。这些样品可用 X 射线衍射法来测定构象中的那些规则重复区域，即蛋白蛋中的 α-螺旋和 β-片层以及 A 型和 B 型的 DNA、RNA 结构。对于这些样品，X 射线衍射法也只能验证它们的结构是否符合事先提出的某种几何模式，而不能作为其结构惟一的、客观的测定方法。

X 射线衍射法与样品的单晶制备法相结合，可以成为结构测定中最有效的方法。从仅由几个原子所组成的分子直到由好几万个原子所组成的病毒的结构都已用这一方法进行了测定。在一个单晶中，所有分子都排列在具有固定的相对位置和方向的一个立体晶格中。衍射图谱中每一点的强度都可测出，故据此可获得样品全部的立体结构信息。

问题：晶体衍射法测定蛋白质结构的优点和限制分别是什么？

1. 该技术的应用范围很广，可测定的样品包括蛋白质、酶、核酸和病毒，且不受分子大小的限制。
2. 不是所有蛋白质都能形成结晶。特别是对于内在膜蛋白来说更是如此，它们只有在去垢剂存在的条件下才可溶解下来。
3. X 射线衍射法对于绝大多数蛋白质晶体来说都不可能达到实际的原子水平的分辨率。由于该方法所固有的缺陷，使得蛋白质晶体中包含许多结构组成精确信息的大衍射角衍射图不能被测到，故在对蛋白质结构进行测定前，一般先必须知道其氨基酸的序列组成。

核磁共振（NMR）波谱法

NMR 法测定蛋白质结构的技术仅在最近十年间才发展起来；1986 年第一次用该技术完整地测定了一个蛋白质的立体结构。核磁共振现象的产生是由于原子核被置于磁场中时核能级随着非零自旋运动而变得不平衡。因此可通过应用波长相当于这些不同能级间差值的射频脉冲来使核能发生改变（即在不同能级间跃迁）。应用这种使核能发生改变的方法还可以观察到无向量及偶极核间的相互作用。通过无向量相互作用可观察到蛋白质的扭转角度，而偶极相互作用则可测定质子间距。可通过测定蛋白质的氨基酸序列组成，再结合以上所测得的肽平面间的二面角及质子间距的数据而计算出蛋白质的结构。

需要指出的是 NMR 法测定的是蛋白质处于天然溶解状态下的结构。由于蛋白质分子在溶液是处于运动状态，故 NMR 法测定的是无向量值（二面角和质子间距）；这是它与 X 射线晶体衍射法的根本不同之处，因为在 X 射线衍射法中可通过稳定的晶格而获得分子的向量“图像”。由于 NMR 法可测定溶液中的蛋白质结构，故可应用这一技术来研究蛋白质运动的复杂过程。

问题：NMR 波谱法测定蛋白质结构的优点和限制分别是什么？

1. 该技术可测定天然溶解状态下的蛋白质及核酸结构。
2. 该技术的分子质量测定上限为 35～40kDa。即使如此，由于绝大多数蛋白质的结构域分子质量均低于该上限，故可应用 NMR 来研究结构域的构象。

3. 该技术的分辨率不如 X 射线晶体衍射法那样精确，但可获得许多蛋白质动力学中的有用数据。

例 4.18

一个样品处于晶体状态下和处于溶液中的天然状态下所测得的结构有何相关性？

蛋白质晶体所含溶剂约占其体积的 40%～70%。故几乎不存在影响分子结构的分子间直接接触作用。以不同的结晶形式来测定某一蛋白质的结构，尽管每种晶形的含水量不同，但总的测定结果一般都是相同的。这也是用 NMR 法或蛋白质 X 射线晶体衍射法测定结果真实可靠的原因。另外发现有些酶在结晶状态可保持其全部活性，这也暗示晶体的稳定性可能不会改变蛋白质的天然构象。

例 4.19

对于一个分子质量为 20kDa 的蛋白质，首先应采取什么方法来决定用蛋白质晶体衍射法和（或）NMR 波谱法来测定其结构更为合适？

(a) 凝胶过滤法或分析性超速离心（沉降平衡）实验可用来确定是否该蛋白质本身聚合形成寡聚体。若该蛋白质为寡聚体形式，则测定结构时优先采用 NMR 波谱法，即使二聚体的分子质量达到了该技术测定范围的上限。

(b) 若该蛋白质不是寡聚体，则只要样品浓度等于或超过 1 mmol/L，样品量为 250 μl，即可采用 NMR 法测定其结构。

(c) 即使该蛋白质为寡聚体，只要这些寡聚体都是相同的，则可采用 X 射线晶体衍射法测定其结构。可以采用不同的实验条件（例如不同的缓冲液和 pH 值）来找到合适的结晶条件。由于蛋白质在其等电点（pI）溶解度最低，故 pI 为一较好的结晶条件。

问题解答

蛋白质的纯化和定性

4.1　已知一纯的含血红素蛋白质，其含铁量占全部重量的 0.426%，则该蛋白质最小分子质量是多少？

答：

最小分子质量是指一个分子只含一个铁原子时的分子质量。因此每 100g 蛋白质中都含有 0.426 g 铁，则含 1mol（56g）铁的蛋白质是

$$\frac{100\times 56}{0.426}=13\ 145\ \text{g}$$

含有 1mol 铁原子的蛋白质量为 13 145g，该值即为蛋白质的摩尔质量，因此它的最小分子质量为 13 145。该值与含血红素的蛋白质细胞色素 c 的分子质量接近，故是一个合理数值。但是，若 1 个蛋白质分子所含的铁原子数不止 1 个，则该蛋白质的分子质量是 13 145 的倍数。

4.2　Thr 占胰岛素中全部氨基酸重量的 1.8%。若 Thr 的相对分子质量为 119，则胰岛素的最小相对分子质量是多少？

答：

由于氨基酸缩合形成肽键时脱去水分子，Thr 残基的相对分子质量则为 119 − 18 = 101。若假设每分子胰岛素只含 1 个 Thr 残基，则其相对分子质量 101 相当于胰岛素分子质量的 1.8%，即

$$M_r=\frac{101}{0.018}=5\ 600$$

可物理法测定解聚溶液中胰岛素的分子质量，证实该值是正确的。

4.3 血红蛋白 A（人体主要的正常血红蛋白）的等电点 pH 值为 6.9。变异血红蛋白 M 中 α 链 67 位的 Glu 残基取代了正常血红蛋白 A 该位置上的 Val 残基。这种取代使得血红蛋白 M 在 pH 为 7.5 时的电泳行为会发生怎样的改变？

答：

由于 pH 为 7.5，高于 HbA 的等电点，则它带负电向阳极泳动。在 pH 为 7.5 时，Glu 残基带负电，而 Val 不带电。故在这一 pH 条件下，HbM 所带的负电荷增多，向阳极泳动速度会更快。

4.4 将卵清蛋白（pI＝4.6），脲酶（pI＝5.0）及肌红蛋白（pI＝7.0）这三种蛋白装入一根 pH 为 6.5 的 DEAE－纤维素离子交换柱。用 pH6.5 的稀缓冲液来洗脱，然后用含有更高浓度的 NaCl 的同样缓冲液洗脱。这三种蛋白质将以何顺序从柱中被洗脱下来？

答：

pH6.5 时，卵清蛋白和脲酶均带负电荷，故可与 DEAE－纤维素结合。在相同 pH 条件下，肌红蛋白带正电荷，故立即被洗脱下来。随着洗脱液盐浓度的增加，静电引力减弱；脲酶随即被洗脱下来，卵清蛋白最后被洗脱下来。

4.5 一个 M_r＝24 000，pI＝5.5 的酶被两种蛋白质所污染。一种蛋白质分子质量与酶相同，pI＝7.0，另一种蛋白质 M_r＝100 000，pI＝5.4。如何进行纯化？

答：

可用凝胶过滤法除去高分子质量的污染蛋白。在剩余的混合物中，可用离子交换层析法（即如习题 4.4 所述）将低分子质量蛋白质分离出来。

4.6 (a) 用胰蛋白酶处理下列小肽，它会断裂成什么样的肽片段？

Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Arg-Ser-Gly

(b) 如果上述产物都用2,4－二硝基氟苯（FDNB）处理，然后用酸水解，将可分离出何种 DNP－氨基酸？

答：

(a) 胰蛋白酶可在 Lys 和 Arg 残基的羧基侧水解肽。将其水解为三个小肽：Ala-Ser-Thr-Lys，Gly-Arg，Ser-Gly。(b) 三个小肽用 FDNB 处理再酸水解后，可形成游离 N 端氨基酸的 DNP 衍生物：DNP-Ala，DNP-Gly，DNP-Ser。注意 Lys 的氨基也可与 FDNB 反应；但可用色谱法将 Lys 的 DNP 衍生物与其他 α-DNP 衍生物区别开来。

4.7 以下数据来自一个八肽的部分水解分析结果：

氨基酸组成：Ala，Gly_2，Lys，Met，Ser，Thr，Tyr

用 CNBr 裂解：(1) Ala，Gly，Lys，Thr

(2) Gly，Met，Ser，Tyr

用胰蛋白酶消化：(1) Ala，Gly

(2) Gly，Lys，Met，Ser，Thr，Tyr

胰凝乳蛋白酶：(1) Gly，Tyr

(2) Ala，Gly，Lys，Met，Ser，Thr

N 端氨基酸：Gly

C 端氨基酸：Gly

确定该八肽的氨基酸的序列。

答：

可用所给数据得出一套重叠肽，这是因为 CNBr 是在 Met 处切断肽链，而胰蛋白酶是在 Lys 或 Arg 处水解肽链，胰凝乳蛋白酶则在其香族氨基酸处断开肽链。故该八肽的序列是 Gly-Tyr-Ser-Met-Thr-Lys-Ala-Gly。

4.8 羧肽酶 A 可从肽链的 C 端开始逐一水解氨基酸，但 C 端氨基酸为 Pro、Lys 或 Arg 者

除外。图4-13所示为一个蛋白质用羧肽酶A处理后所释放出的氨基酸序列，请推出该蛋白质C端序列组成。

答：

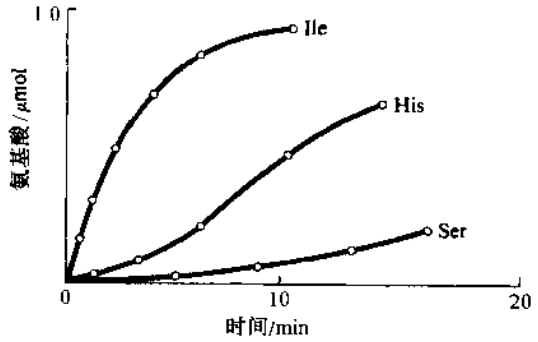


图4-13

根据图可知其C端序列为-Ser-His-Ile。

4.9 人工合成的多肽：多聚L-谷氨酸，它可在pH=2的溶液中形成α-螺旋，但在pH=7的溶液中则不能。解释其原因。

答：

溶液pH=2时，多聚L-谷氨酸的侧链大部分都不带电荷而处于质子化状态。在pH=7的溶液中，则大部分侧链都带有负电荷。负电荷使氨基酸相互排斥而α-螺旋结构不稳定。

4.10 多聚L-谷氨酸形成100%的α-螺旋构象时在ORD光谱中表现为一个负槽，其$[\alpha]_{233}=-15\,000°$；若形成无规则卷曲构象时，$[\alpha]_{233}=-1\,000°$（下标233指测定光的波长）。请计算$[\alpha]_{233}=-7\,160°$的一个蛋白质中α-螺旋所占的比例，假定该蛋白质仅由α-螺旋和无规则卷曲两种构象组成。

答：

100%的α-螺旋构象对应的$[\alpha]_{233}=-1\,000°$，故

$$\text{螺旋}\%=\frac{-[\alpha]_{233}-1000}{15000-1000}\times 100\%=\frac{6160}{14000}\times 100\%=44\%$$

4.11 肌红蛋白溶于pH大于6.0的溶液中时，可产生一特异性旋光值$[\alpha]_{233}=-12\,000°$。若将溶液pH调到2.0，则该旋光值变为$-2\,000°$，解释其改变的原因。

答：

可用习题4.10的方法计算出肌红蛋白在这两个pH条件下形成α-螺旋的比例，其前提是假定肌红蛋白只有α-螺旋和无规则卷曲两种构象。在pH6.0时，螺旋比例为79%，而在pH2.0的溶液中，螺旋比例只有7%。故可得出结论：在较低的pH条件下，肌红蛋失去了螺旋构象，也就是说，发生了变性。

4.12 下列给出了一个肽的部分序列组成：

-Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly-，请推断这个肽所组成的蛋白质能形成何种构象？

答：

该序列数像胶原蛋白的一部分。特别是它符合（Gy-Pro-X）模式，且具有胶原蛋白所特有的羟脯氨酸。故该序列可能来自一个胶原蛋白。

4.13 胰岛素由两条多肽链组成：A链和B链，中间由二硫键连接。将胰岛素变性，还原后再氧化，测定发现其活性只有7%可被恢复。这一数值正好相当于胰岛素中随机配对形成二硫键时的活性大小。以上的结果如何与“氨基酸的序列组成指导蛋白质折叠”

的假设相符合呢?

答:

胰岛素最初合成时是作为胰岛素原的形式存在的。合成后肽链折叠,此时要有一部分分子(C肽)被切除,剩余的A链和B链再通过二硫键连接。故天然胰岛素是不含C肽的,这样就缺失了一部分指导肽链折叠过程的必要信息。

4.14 胰岛素和血红蛋白均为由1个以上肽链所组成的蛋白质。比较这两种蛋白质中肽链间的作用力形式。

答:

胰岛素中的两条肽链,最初都来源于同一条肽链,这两条肽链间由共价二硫键相连。血红蛋白由四条多肽链组成,相互间只通过非共价相互作用结合在一起。

4.15 核糖核酸酶中含有四对二硫键。如果将这些二硫键全都还原为硫基后再氧化,则再形成二硫键的组合比率有多少?

答:

第一个二硫键形成时,则一个Cys残基可与其余七个Cys残基中的任何一个形式二硫键。形成第二个二硫键时,其中一个Cys残基可与其余五个中任何一个Cys配对。形成第三个二硫键时,其中一个Cys可与其余三个中任何一个Cys配对。一旦形成三个二硫键后,则最后一个二硫键的形成也只有一种选择了。因此,二硫键的组合比率是:$7\times5\times3=105$

因此,一对二硫键能正确形成的比率为:

$$1/105=0.0095,\text{ 或 }0.95\%。$$

4.16 胰岛素序列中8位的甘氨酸残基具有转角 $\Phi=82°$, $\Psi=-105°$,它位于图4-5中的Ramachandran图的不利区域(记为X)。这是为什么?

答:

甘氨酸具有非常小的侧链,一个氢原子。图4-5是为丙氨酸(其侧链为甲基)所定的图。因此,这个构象只适用于甘氨酸,而不是丙氨酸的甲基。

4.17 用例4.7的数据估价一个洗脱体积为155ml的酶的分子质量。

答:

从图4-2得,与155ml洗脱体积相应的 $\lg M_r$ 值为4.8。假定该酶的密度和形状与参照标准相似,其相对分子质量为63 000。

4.18 一个酶在pH为7的水(缓冲液)中凝胶过滤被确定的表观相对分子质量为160 000。当用SDS凝胶电泳分析,只有一条带,该带的表观分子质量为40 000。这如何解释?

答:

去污剂SDS可导致四级结构解离,使得所测定的分子质量为组成亚单位的相对分子质量。该数据提示:该酶由四个相同的亚单位($M_r=40\ 000$)构成 $M_r=160\ 000$ 的一个四聚体。

4.19 在用凝胶过滤方法测定β-乳球蛋白相对分子质量的过程中,不同的样品浓度得到的数据如下:

蛋白质浓度/(g/L)	M_r
10	36 000
5	35 000
1	32 000
0.1	25 000

SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析得到的相对分子质量为18 000，这与该蛋白质中已知的氨基酸序列相吻合。解释这些数据。

答：

这些数据显示：β-乳球蛋白多肽链的相对分子质量为18 000，并且在高浓度下该蛋白质以二聚体（$M_r=36\,000$）的形式存在。然而，通过稀释，该二聚体（以可逆的非共价相互作用维持）发生了部分解离：$A_2 \rightleftharpoons 2A$。

4.20 以下列在20℃得到的实验数据计算蛋白质的 M_r。

$S=4.2\times10^{-13}$s

$D=1.2\times10^{-10}m^2\cdot s^{-1}$

$\bar{v}=0.72ml\cdot g^{-1}$

$\rho=0.998g\cdot mL^{-1}$

答：

方程式（4.1）：

$$M_r=\frac{RTS}{D\ (1-\bar{v}\rho)}$$

R（气体常数）$=8.314J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1}$

T（绝对温度）$=293K$

$$M_r=\frac{8.314\times293\times4.2\times10^{-13}}{1.2\times10^{-10}\times(1-0.72\times0.998)}$$

$$=\frac{10\ 231\times10^{-13}}{0.338\times10^{-10}}$$

$$=30kg\cdot mol^{-1}\text{ 或 }30\ 000g\cdot mol^{-1}$$

相对分子质量为：30 000。

补充问题

4.21 列出（a）肌肉的主要蛋白质，（b）骨，结缔组织和皮肤的主要蛋白质，（c）毛发和羽毛的主要蛋白质。

4.22 纯的血红素蛋白含有0.326%的铁。如果该分子只含有一个铁原子，它的分子质量是多少？

4.23 在电场中下列蛋白质将向什么方向移动（向阳极，向阴极，或不动）？

(a) 血清白蛋白（pI=4.9），pH8.0

(b) 脲酶（pI=5.0），pH9.0

(c) 核糖核酸酶（pI=9.5），pH4.5；pH9.5；pH11.0

(d) 胃蛋白酶（pI=1.0），pH3.5；pH7.0；pH9.5

4.24 用Sephadex G-200凝胶过滤分析，下列蛋白质以什么顺序出现：

核糖核酸酶（$M_r=12\,000$）；醛缩酶（$M_r=159\,000$）；血红蛋白（$M_r=64\,000$）；β-乳球蛋白（$M_r=36\,000$）；血清白蛋白（$M_r=65\,000$）？

4.25 区别术语：一级结构，二级结构和三级结构。

4.26 下列氨基酸残基——蛋氨酸，组氨酸，精氨酸，苯丙氨酸，缬氨酸，谷氨酰胺和谷氨酸——哪个可存在于（a）蛋白质的表面，及哪个存在于（b）蛋白质的内部？

4.27 下列存在于不同部位的氨基酸残基功能是什么？

(a) 蛋白质表面的苯丙氨酸。

(b) 蛋白质内部的天冬氨酸。

4.28 什么是蛋白质结构中的结构域？给出一个实际蛋白质结构域的例子。

4.29 “氨基酸残基的特殊构象位于 Ramachandran 图中不利的区域”，这句话的意思是什么？

4.30 (a) 为什么尿素可使蛋白质变性？(b) 尿中存在尿素，为什么我们的肾脏不变性？

4.31 (a) 在蛋白质中非共价相互作用的重要性是什么？(b) 弱的相互作用如何能形成稳定的结构？

4.32 螺旋中的螺距（p）定义为 $p = dn$，n 是每圈中重复单位的数量，d 是每个沿着螺旋轴重复单位的距离。因此，螺距可度量：从螺旋的一个点到该螺旋下一圈上相应点的距离。

(a) 什么是每个残基距离和 α-螺旋螺距？

(b) 如果它是一个连续的 α-螺旋，肌红蛋白将有多长？

(c) 如果它是一股 β-折叠片层，肌红蛋白将有多长？

(d) 如果完全伸展（距离/残基 = 0.36 nm），肌红蛋白将有多长？

4.33 推测下列哪个聚氨基酸在室温溶液中将形成 α-螺旋？哪个将形成无规则结构？

(a) 聚亮氨酸，pH = 7.0

(b) 聚异亮氨酸，pH = 7.0

(c) 聚精氨酸，pH = 7.0

(d) 聚精氨酸，pH = 13.0

(e) 聚谷氨酸，pH = 1.5

(f) 聚苏氨酸，pH = 7.0

4.34 在四级结构中什么力量聚集蛋白质亚单位？

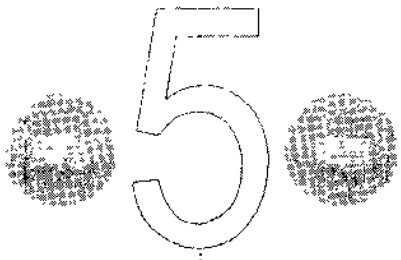
4.35 聚脯氨酸可形成单股螺旋，该单股螺旋与胶原蛋白三重螺旋中的一股较为相似，但是，它不能形成三重螺旋。为什么不能？

4.36 聚（甘氨酸-脯氨酸-脯氨酸）可形成三重螺旋。为什么？

4.37 对照比较 (a) 胰岛素，(b) 血红蛋白和 (c) 胶原蛋白的结构，它们全是由两个以上链构成的蛋白质，但却是通过不同类型的键将这些链聚集在一起的。

4.38 形成 α-螺旋显著的稳定性的原因是什么？

4.39 (a) α-螺旋和 β-折叠片层结构在哪些重要的方面不同？(b) 它们有相似的地方吗？



蛋白质：超分子结构

5.1 导言

虽然蛋白质是大分子，但与细胞比较（甚至与构成细胞的超分子结构，如：原生质、细胞器膜、核糖体、染色体、丝状结构、酶复合物和病毒比较；见第1章）却是小的。超分子结构也存在于细胞外；比如说，它们是结缔组织的基本的组成成分，如：腱、韧带、软骨和骨。超分子结构可由从小（如：膜脂类）到大（如：蛋白质、DNA和RNA）的各种不同类型的分子构成。

这些结构与各种细胞的各种生理过程有关；对于一个有机体或一个有机体中的任何细胞，这些结构是保持其正常功能所必需的。某些超分子结构（如：细胞骨架网络支撑着小肠刷状缘细胞的微绒毛）呈现出相当稳定的状态，即：在细胞的整个生命过程中它们的结构并不发生变化。然而，大多数的结构是处于明显的变动之中的；有这样几个方面：①其中的成分快速的翻转（如：大多数细胞膜和某些细胞外基质）；②它们可完成机械运动（如：纤毛、鞭毛和肌纤维）；③它们可对机械力或某些外部的刺激做出反应（如：耳中内毛细胞表面的静纤毛的振动可对声音做出反应，以及人红细胞在循环系统中流动时对液体的压力和机械挤压做出反应而发生显著的变形）；④它们可为特殊的目的而被构建起来而后又被拆除（如：海胆精子的针样顶体突的构成是用来协助精子穿过卵子的细胞外物质和细胞膜，随后该顶体突就会消失）。

本章的内容将侧重于主要以蛋白质为基础的超分子结构，以及与其结构和构建相关的某些特征。重点讨论细胞外的（细胞外基质）和细胞内的（细胞骨架网络）超分子结构，这些网络结构和功能之间的关系，其运动特征和作用，可导致疾病或与疾病相关的遗传或先天的缺陷等。

☞**例5.1**

以上所列的运动特征常联合出现在许多类型的超分子结构中。有丝分裂和减数分裂纺锤丝是极好的例子。构建纺锤丝的目的是将正在进行分裂的细胞中的染色体分离并分配到子代细胞中，随后该结构消失。当然，染色体的分离需要纺锤丝中的成分提供机械力和所消耗的能量。

5.2 超分子结构的装配

许多超分子结构主要是通过大分子（如：蛋白质）的非共价的逐步联合形成的。装配过程受同一类化学和物理规律所控制（控制着蛋白质折叠和四级结构的形成，见第4章）。这个装配过程的驱动力主要是依赖于大量形成的疏水键，氢键和离子键（存在于由范德华力作用相互接触的亚单位上互补的位点之间）。另外，也存在共价交联（如：相邻亚单位上半胱氨酸之间的二硫键）。互补结合位点的特异性是指亚单位之间相互聚合具有固定的方位。

在亚单位内和亚单位之间的构象变化对于装配过程是非常重要的。这些结构变化对于由独立成分构成的最终结构的整体稳定性是重要的。它们可严重地影响超分子结构装配的高度

选择性及亚单位相互之间的合适的方位。

在某些情况中，装配过程是由大量相同亚单位结合形成复杂结构而实现的。该逐步装配过程具有一定的优点。首先，它减少了编码复杂结构的遗传信息的数量；其次，如果有缺陷的亚单位可从最终结构中被除去，它可使错误避免（见题 5.1）。

如果装配超分子结构的所有信息均存在于组成分子自身当中，该装配过程称为自我装配。

例 5.2

核糖体是较大的大分子复合物，其组成成分包含了所有必需的自我装配信息。大肠杆菌核糖体的沉降系数为 70S，它由两个亚单位（50S 和 30S）构成，总质量为 2.8×10^6Da，并具有 58 个不同成分。这些成分中有三个是 RNA 分子，它们占总质量的 65%，它们作为导引各种蛋白质的框架或模板。如果被纯化分离的组分以适当的顺序并在正确的条件下混合在一起，它们可自然地装配形成具有完全活性的核糖体（图 5－1）。

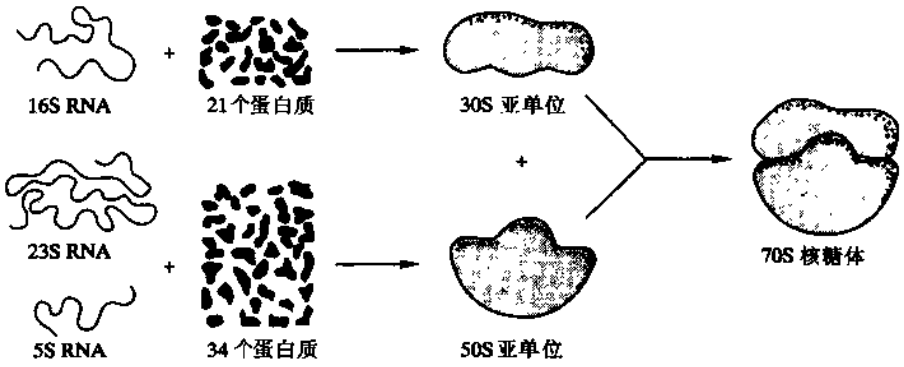


图 5－1　大肠杆菌核糖体装配的步骤

某些病毒，特别是烟草花叶病毒（TMV），也可自我装配。TMV 颗粒可被分离为其蛋白质组分和 RNA 组分，通过将这些组分重新混合在一起，它们可重新装配成具有感染性的病毒颗粒。

例 5.3

TMV 是由 2130 个相同蛋白质亚单位桶状外壳围绕着 6400 个核苷酸的 RNA 分子所构成。1955 年，发现外壳蛋白质亚单位与 RNA 可以分离，而在合适的条件下它们可自然地自我装配重新形成完全具有活性的病毒颗粒。这是一个多步骤过程，一个 34－单元双层蛋白质圆盘是重要的中间体，基于与 RNA 的结合，该中间体转变为一个每圈 16.33 个蛋白质亚单位的螺旋结构（图 5－2）。若没有 RNA，蛋白质可聚合为无限长度的螺旋管。RNA 的存在可协助这个聚合过程并形成一个固定的 300nm 长度的病毒颗粒。

由较小的蛋白质多拷贝构建的病毒外壳显示了在遗传信息方面的节省。甚至对于具有数个外壳蛋白质的更为复杂的的病毒来讲，这种节省仍然是很大的。例如：在脊髓灰质炎病毒中，外壳为 115 kDa 前体蛋白质聚合形成的五聚体；这些五聚体的每个多肽通过蛋白质水解作用被裂解形成四个蛋白质；十二个这种蛋白水解加工的五聚体联合形成完整的外壳。请注意，在这个例子中，自我装配并不是最终结构完整而正确形成所需的惟一因素。另外，需要从这个完整的系统外输入用于加工的蛋白酶。

其他的外输入例子包括：使用支架和模板导引装配过程，以及将已含有所需信息的结构用于形成新的拷贝。这些例子有噬菌体 T4 病毒的装配（涉及模板蛋白质的使用），以及新线粒体的形成（新线粒体来自已存在的线粒体的分裂和生长）。

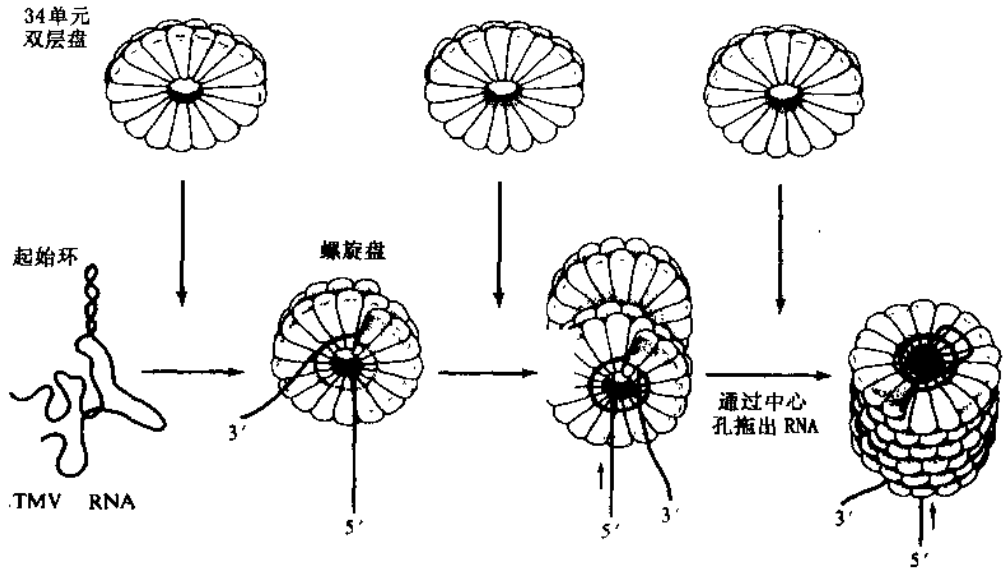


图 5－2　烟草花叶病毒的装配

例 5.4

噬菌体 T4 是一个复杂的病毒，它能感染某些细菌。该病毒的蛋白质外壳（头、尾和尾纤维）含有 40 个结构蛋白质。T4 是一个很好的例子来说明：逐步装配过程的空间和时间上的调控，以及调控装配过程中外输入的作用。装配过程需要 13 个蛋白质，但这些蛋白质并不存在于最后形成的完整病毒颗粒中。这类蛋白质之中，有 3 个是作为临时的模板促进尾基片的形成（图 5－3）。还有一个是蛋白酶，它在头部的装配基本上完成后，将头部的主要蛋白质进行裂解（从 55 kDa 到 45 kDa）。尾部达到正确的长度时，盖蛋白置于顶部，这时完整的头部才可与盖蛋白结合（图 5－3）。最后，完整的尾纤维结合在基片上，这需要一个酶催化反应。

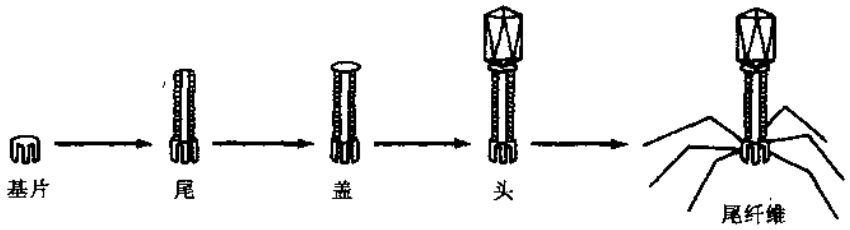


图 5－3　T4 逐步装配的顺序

生物学中最迷人的问题之一是：常由一系列重复单元构建而成的器官、细胞、细胞器、纤丝和其他大分子复合物，它们是如何达到一个限定的大小后停止生长的？TMV 桶型外壳长度的控制是一个很好的例子（例 5.3）。至此，已清楚的是：外壳蛋白质与其包裹的 RNA 之间的相互作用是决定性的。而在其他情况中，如噬菌体 T4 尾部的长度，以及骨骼肌纤维中重复收缩单元高度规则的长度，其调控机制目前尚不清楚。

有许多可能的解释，而下列基于微变规律的解释只是一个简单的机制。两类不同长度的杆状蛋白质平行聚合形成一个线性的复合物（图 5－4）。它将生长，直至每个杆状物的末端

图 5－4　微变规律示例

严格一致。那么，没有了重叠部分，该复合物将不再生长。

5.3　蛋白质的自我聚合

大量的具有生物学活性的蛋白质以大的复合物的形式存在于溶液中。自我装配最简单的实例与单一类型亚单位的自我聚合有关。许多蛋白质拥有四级结构，这是由相同的亚单位装配成的规则的几何结构，例如：胰岛素的储存形式具有排列成六角形的六个单体，储铁蛋白质（铁蛋白）具有排列成20面体的24个亚单位。自我装配和对称体的某些内容介绍如下。

对称二聚体

问题：通过什么方式蛋白质能自我装配形成规则几何形的寡聚体？

如果结合位点自我互补，就可形成一个对称的二聚体［图5－5（b)］。在两个亚单位之间将有一个对称的二分体（或二部旋转的）轴，因此，一个亚单位以该轴心旋转180°可与另一个亚单位重叠。（如果结合位点不存在自我互补，你可自己证明：这将不形成对称体的二分体轴。）这样形成的二聚体本身可作为更大聚合体的一个亚单位；例如：两个二聚体可通过不同的结合接触面聚合形成一个具有两个对称体轴的四聚体。在这种情况下，存在两个对称体轴，该对称体被称为双面体。

原聚体常用于描述参与自我聚合反应的基本单元。在上述问题中，单体是二聚体的原聚体。同样，由同样的二聚体聚合形成的四聚体，六聚体等等，该二聚体就称为这些二次聚合体的原聚体［图5－5（c)］。

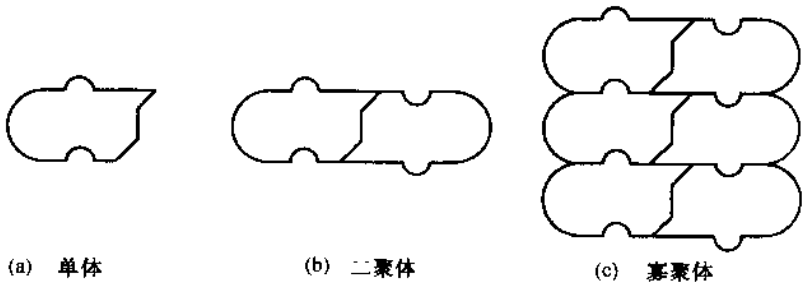


图5－5　原聚体自我聚合的简单图示

旋转对称体

如果结合位点与蛋白质其他位点互补，那么将形成一个链。若在原聚体之间存在一定的角度，该链将自身闭合形成一个环（图5－6)。这个环的大小变化较大，从一个二聚体到更

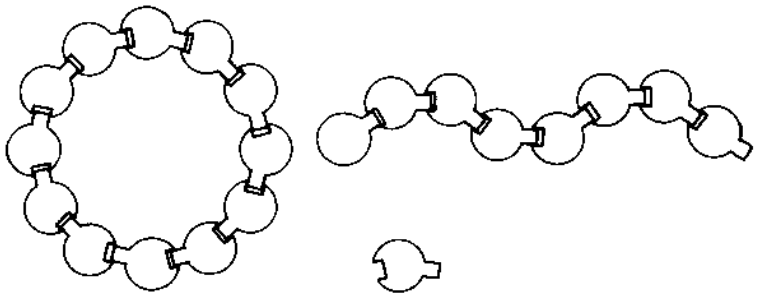


图5－6　当蛋白质亚单位在适当的固定角度进行相互作用时可形成环状或螺旋状

大的寡聚体。这样的规则环拥有旋转对称体，并且该类型的对称体通常存在于具有3、5或其他奇数原聚体的蛋白质中，尽管它也可存在于具有偶数原聚体的寡聚体中（如：胰岛素的储存形式，它是一个六聚体）。

例5.5

血凝素（存在于流感病毒的膜中）是一个三聚体（图5-7）。每个原聚体是由一个单独的多肽链折叠成的两个片段：一个α-螺旋的“柄”和一个球型的头（含有一个八链β-片层结构；该结构中含有与宿主细胞受体的结合位点）。来自每个原聚体的“柄”通过它们非极性氨基酸残基的相互作用形成了一个左手超螺旋，或盘绕的线圈。这些疏水的相互作用提供稳定该三聚体的主要的作用力。形成的对称体三重周期的轴，示于图5-7。

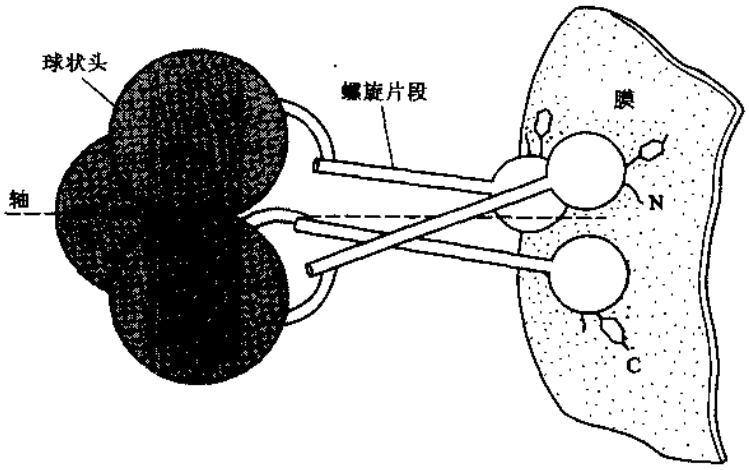
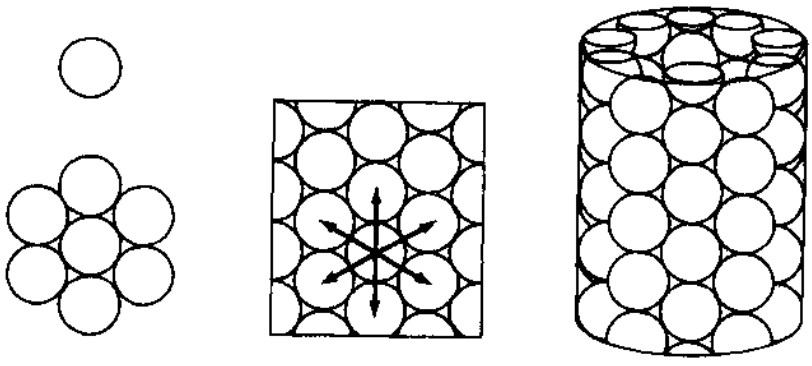


图5-7 流感病毒血凝素三聚体的图解

无限的自我聚合

在许多情况下，一个链能形成开放末端，其他的原聚体可没有限制地连续被加到该链末端空出的结合位点。这称为无限的自我聚合。如果在原聚体之间的角度是固定的，该开放末端的链将形成一个螺旋（图5-6）。

(a) 双螺旋（如：肌动蛋白）



(b) 片层　　(c) 管状

图5-8 双螺旋、片层和管状结构的形成，图示亚单位之间的多重相互作用（箭头所示）

如果两个螺旋链相互缠绕形成双螺旋，或如果该螺旋随后转角中的单体是连接状态的，由于每个单体与另外一条链上的两个单体以及其自身所在链中相邻的两个单体相互作用，那么，其稳定性就会显著的增加［图 5－8（a)］。

片层和闭合面

在同一平面中的多种相互作用可导致片层的形成，如：每个单体可在六聚体闭合排布中与六个相邻的单体相互作用（图 5－8)。通过轻度的再调整，片层可被转变为管桶状（图 5－8)，甚至球状。由于可形成最大数量的相互作用，这些闭合结构可提供更大的稳定性。某些病毒的蛋白质外壳是这方面最好的例子。由微管蛋白构成的微管可轻易地在片层和管状之间相互转变，至少纯化的形式中是如此。

例 5.6

在番茄丛矮病毒中，180 个相同的蛋白质亚单位（M_r=41 000）形成一个壳，这个壳围绕着含有 4800 个核苷酸的 RNA 分子。从几何学上来讲，以明确的对称方式组入球形壳的相同的亚单位数量不会超过 60 个。这限制着体积，因此，为了容纳更多的 RNA 就需要更大的壳。这可通过使对称体松弛来实现；亚单位可分离为三套 60，每套以严格的对称体形式包装。然而，每套之间的关系是不同的，以至整个的包装只是准相等物。

平　衡

聚合反应可以平衡常数来表征。聚合反应中每个步骤的平衡常数的实验测定可提供关于该聚合系统特征的重要的信息。特别是可以获得聚合方式（如：单体-二聚体、单体-四聚体，等等）和聚合强度（即：各种寡聚体在各种总浓度下能够存在的程度)。在一个溶液条件范围（如：盐浓度和温度）内对聚合常数的评价可用来获得聚合各步骤的焓和熵，以及与装配过程有关的价键类型等方面的信息。注意，这些信息可以在结构信息完全缺乏的情况下获得，尽管任何可利用的结构信息可用来协助对热力学数据的解释。

例 5.7

溶质的二聚合反应：$2A \rightleftharpoons A_2$

可被二聚合反应常数所描述，$K_2 = [A_2] / [A]^2$　　(5.1)

此处的方括号表示摩尔浓度（该平衡常数的定义在低溶质浓度的情况下有效；也就是说，在这种情况下系统为理想状态)。该关系式显示二聚体的比例随总分子浓度而增加。相反，稀释将导致解聚（见问题 5.4)。

问题：在体外观察到的装配系统的性质总是与该系统在体内的性质相同吗?

未必！体外实验通常是在接近理想的条件下进行的。而相反，体内的条件（如：细胞质，或细胞器内部）是相当拥挤的。蛋白质的总浓度通常在 200～500g/L 的范围内，并且还有高浓度的小分子的存在。水环境的多至 50%（或更多）的体积被所有的这些溶质所占据。这种拥挤的环境是非常不理想的，其结果将严重地改变聚合系统的性质。

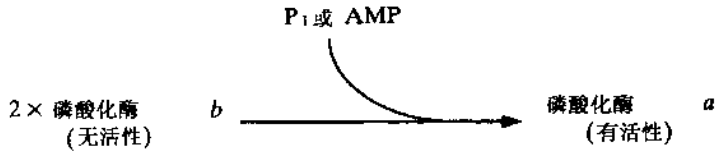
例如，如果二聚体所占据的体积少于两个单体所占据的体积，那么二聚体将会越来越多，进而导致水环境越来越拥挤。这种变化极富戏剧性——在理想条件下难以检测的聚合作用，在细胞中拥挤的条件下却可显著的发生。

酶的催化作用也在许多方面受到这种拥挤的影响。例如，一个经历单体-四聚体的反应的酶只有成为四聚体时才具有催化活性。如果在拥挤的条件下易于形成四聚体，那么反应速度将增加。以这种方式，速度常数可被改变几个数量级。

其他分子（小或大）的结合也可改变聚合的程度。例如，如果聚合后的形式利于与一个小分子（或配体）结合而不是原聚体，那么，该配体的存在将促进聚合。相反，该配体优先与原聚体结合，那么解聚合将被促进。这对调节聚合状态，以及超分子结构的装配和去装配，具有重要的意义。

例 5.8

兔肌肉磷酸化酶存在两种形式：一个基本上无活性的二聚体，磷酸化酶 b，和一个活性的四聚体，磷酸化酶 a。当 AMP 与磷酸化酶 b 非共价结合，或当磷酸化酶 b 的丝氨酸残基被磷酸化酶激酶磷酸化时，该酶转换为有活性的，占绝对优势的四聚体形式（第 11 章）。该反应可通过除去 AMP 或通过磷酸化酶磷酸酶使其丝氨酸去磷酸化，而反转。



这个例子不只是强调配体非共价结合对聚合（及催化作用）的影响，也说明了在蛋白质中特定残基（丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸）的磷酸化和去磷酸化所起到的作用。磷酸化/去磷酸化，对于许多超分子结构的装配、去装配和其他的动力学性质是非常重要的调节因素。

杂聚合

大多数超分子结构是杂聚合的。也就是说，它们含有一个以上类型的亚单位。通常，不同的亚单位具有不同的功能作用（例如催化、调节），或纯粹结构上的作用。

例 5.9

天冬氨酸转氨甲酰（基）酶催化嘧啶核苷酸合成中早期的调节步骤（第 15 章）。源自大肠杆菌的这种酶可被解离为两类亚单位，一个催化亚单位 C_3（$M_r = 100\ 000$），和一个调节亚单位 R_2（$M_r = 34\ 000$）。催化亚单位是一个三聚体，具有催化活性，但不被调节。调节亚单位是一个二聚体。它没有催化活性但可与调节的 ATP 和 CTP 结合。当将它们进行混合，这些亚单位自我装配，形成的复合物具有活性，并可被上述两种核苷酸调节：

$$2C_3 + 3R_2 \rightleftharpoons R_6C_6$$

X 射线衍射研究显示，以与三个调节二聚体背靠背的方式，两个催化的三聚体位于外部的沟槽中（图 5-9）。催化（活性）部位在中心，靠近对称体三重旋转的轴，而调节结合位点位于外侧，远离活性部位。调节分子（ATP 或 CTP）的结合导致构象变化，该变化可传递到复合物的活性部位。

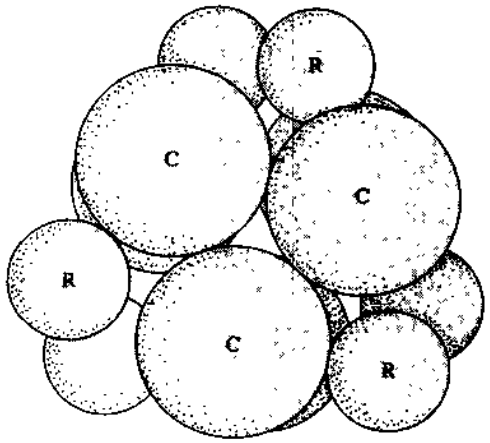


图 5-9 源自大肠杆菌的天冬氨酸转氨甲酰（基）酶中催化（C）和调节（R）亚单位的排布

在某些例子中，酶的特异性可通过与修饰亚单位聚合而被改变。例如乳糖合成酶，该酶催化葡萄糖和半乳糖的键合形成乳糖。该酶由一个催化亚单位和一个修饰亚单位构成。催化亚单位独自催化将半乳糖残基加到糖蛋白的碳水化合物链上；由于修饰物（α-乳清蛋白）的存在，该酶的特异性发生变化，乳糖被合成。

对于在代谢途径中一系列酶催化连续的反应时，这一系列酶装配成多酶复合物是有利的。这种装配使一个酶促反应的产物成为下一

个反应的底物，使这种代谢途径的效率增加（第 9 章）。因此，在很大程度上由反应物在溶液中扩散速度所形成的限制被克服。

例 5.10

丙酮酸脱氢酶复合物催化丙酮酸转化为乙酰辅酶 A。这种转化将碳水化合物的降解与呼吸和氧化磷酸化过程联系起来（第 12 章）。

整个反应是：

$$\text{丙酮酸} + \text{辅酶 A} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{乙酰辅酶 A} + CO_2 + NADH + H^+$$

然而，事实上，这个反应是五个反应的综合；这五个反应由三个酶催化，还需要五个辅助因子：辅酶 A（CoA）、NAD^+、FAD、焦磷酸硫胺素（TPP）、硫辛酸（一个在第 6 位和第 8 位带有硫基的 8 碳酸）。这些反应的详细步骤示于图 12－7 中。

硫辛酸与转乙酰酶（E_2）共价结合。它作为一个“摆动臂”而发挥作用，与丙酮酸脱羧酶（E_1）相互作用接受丙酮酸的羟乙基衍生物，与 CoA 共同形成乙酰辅酶 A，并通过二氢硫辛酸脱氢酶（E_3）再被氧化。

在大肠杆菌中，该复合物的分子质量为 4×10^6Da，并由 60 个多肽链构成。在该复合物的中心，有一个 E_2 的 8 个三聚体构成的核，呈立体对称体排布（图 5－10）。E_3 的二聚体与该立方体的六个面结合。最后，成对的 E_1 结合在该立方体的每个边上包绕着脱氢酶二聚体。转乙酰酶(E_2)的中心位置允许柔性的硫辛酸“臂”将反应物从 E_1 转移到 E_3 或转移到 CoA。

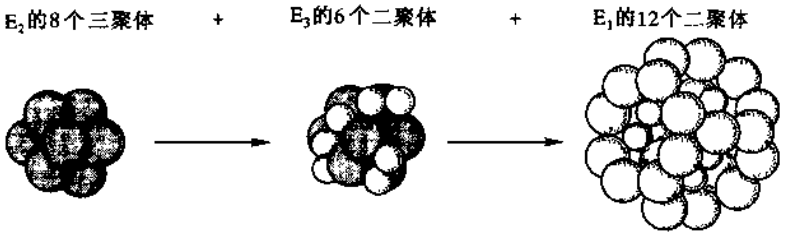


图 5－10　大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合物的模型

哺乳动物酶复合物更大，含有将近 200 个多肽链，使其相对分子质量超过 7×10^6。与上述酶活性类似，哺乳动物复合物含有两个酶作为调节因子，它们通过催化丙酮酸脱羧酶的磷酸化/去磷酸化来对代谢需求做出反应：当对产物乙酰辅酶 A 有需求时该复合物通过去磷酸化而被激活，而当没有乙酰辅酶 A 的需求时该复合物通过磷酸化而被抑制。

执行相似或相同功能的酶复合物在种属间有广泛的差异。酶复合物一个最典型的例子是脂肪酸合成酶，该酶催化由乙酰辅酶 A 合成脂肪酸，并涉及 7 步催化反应（第 13 章）。在大肠杆菌和大多数细菌中，该酶由 7 个不同的酶构成。在较高级的细菌和真核细胞中，亚单位的类型较少。如：酵母酶是一个多酶复合物（$M_r=2.3\times10^6$），只有两类亚单位（A 和 B）和一个 A_6B_6 的化学计量。该亚单位是多催化性的。亚单位 A（$M_r=185\,000$）有三个催化活性，而亚单位 B（$M_r=175\,000$）具有其余的四个。哺乳动物肝脏中复合物是一个二聚体，每个亚单位是由单一多肽链（$M_r=240\,000$）所构成，并且在该多肽链上含有脂肪酸合成所需的所有酶活性。

5.4　血红蛋白

控制生物学活性的能力可通过形成复合物而被加强（例 5.8～5.10）。这方面最好的例子是血红蛋白。血红蛋白是一个四聚体，由两个 α 链和两个 β 链构成（第 4 章）。这些链在结构上彼此是相似的，并且与肌红蛋白也是相似的。这四个链中，每个链折叠成 8 个 α－螺旋片段（珠蛋白折叠），从 N 端开始分别被命名为 A 到 H。

四级结构

在血红蛋白链之间有两中类型的结合。在 $\alpha_1\beta_1$ 以及 $\alpha_2\beta_2$ 每个二聚体内的结合涉及 B，G 和 H 螺旋，以及 GH 环（图 5－11）。这些称为包装结合。在这两个二聚体之间的结合（α_1 和 β_2，α_2 和 β_1）涉及 C 和 G 螺旋，以及 FG 环。这些称为“滑动”结合，这是由于在二聚体之间的滑动可发生在这里。在形成四聚体时，链的表面积的约 20% 被掩盖。这些结合主要是疏水性的，有 1/3 涉及极性侧链的结合是氢键和静电相互作用（或盐键）。

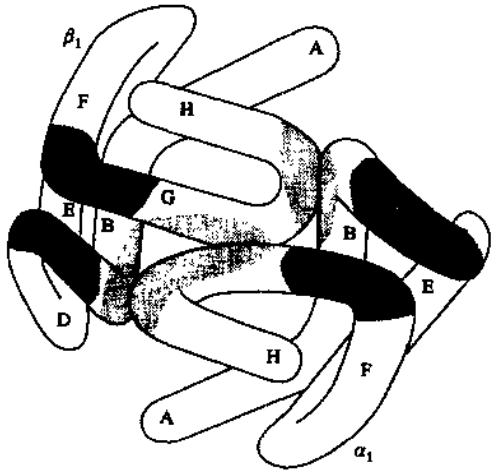


图 5－11　血红蛋白 $\alpha_1\beta_1$ 二聚体。包装结合（淡灰色）将二聚体聚在一起。滑动结合（深灰色）形成与 $\alpha_2\beta_2$ 二聚体的相互作用

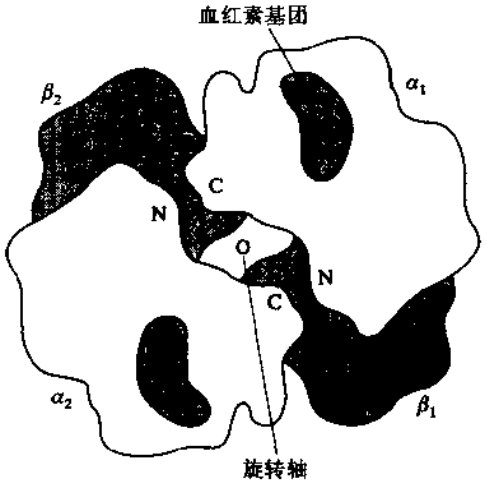


图 5－12　血红蛋白环形对称体图示

可认为血红蛋白四聚体是一个由两个非对称的但相同的原聚体（$\alpha_1\beta_1$ 和 $\alpha_2\beta_2$ 二聚体）构成的一个对称体分子。它们被一个对称体的双重旋转轴而相互关联：如果一个二聚体旋转 180°，它将与另外一个重叠（图 5－12）。

如果 α 和 β 链完全相同，那么，血红蛋白就具有双面对称性，带有两个旋转轴，以及排布在四面体顶点上的四个亚单位。

问题：为什么血红蛋白链可聚合而肌红蛋白却不能？

虽然血红蛋白和肌红蛋白链的序列具有同源性，而且它们都采用珠蛋白折叠，但是，在血红蛋白相互结合链的某些区域中有非常重要的差异。特别是某些表面残基在肌红蛋白中是极性的，而在血红蛋白中是疏水的。例如：B15 残基（B 螺旋中第 15 个残基），在肌红蛋白中是赖氨酸，而在血红蛋白中却是亮氨酸或缬氨酸；FG2 残基（在 F 和 G 螺旋之间的环中第 2 个残基），在肌红蛋白中是组氨酸，而在血红蛋白两类链中却是亮氨酸。在血红蛋白中，这两类残基是 α 和 β 链之间的结合部分。

氧结合与变构效应

当血红蛋白与氧结合形成氧合血红蛋白后，四级结构将发生变化。$\alpha_1\beta_1$ 二聚体在 $\alpha_2\beta_2$ 二聚体上旋转 15°，在 $\alpha_1\beta_2$ 和 $\alpha_2\beta_1$ 的结合上发生滑动，并且两条 β 链相互靠近了 0.7 nm。

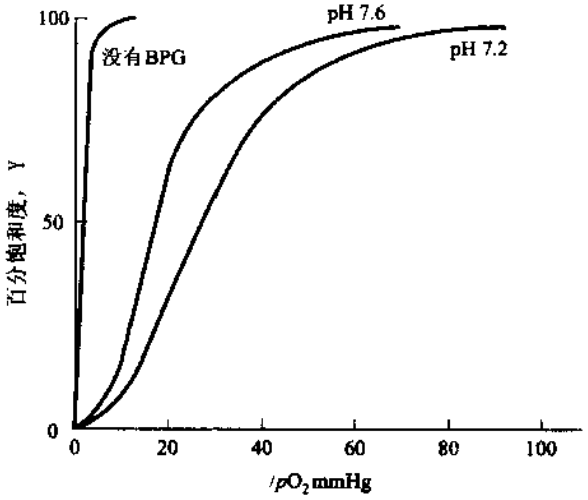
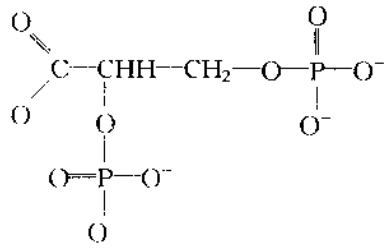


图 5　13　BPG 和 pH 对血红蛋白氧亲和力的影响

四级结构的变化与由于血红素铁结合氧后导致的近端组氨酸（最靠近血红素铁的组氨酸）移动所引起的三级结构的变化相关联。这些变化引起约束四链末端基团之间的盐键断裂。脱氧血红蛋白的结构对氧的亲和力较低（所谓的紧张结构），而氧合血红蛋白的结构对氧的亲和力较高（所谓的松弛结构）。因此，当氧成功地与血红蛋白的血红素基团结合，剩余的血红素基团的氧亲和力将增加。这种协同影响（第 9 章）形成一个 S 型氧离解曲线（图 5　13）。

BPG

化合物2,3－二磷酸甘油酸(2,3－bisphosphoglycerate，BPG；或 2，3－diphosphoglycerate，DPG）产生于许多动物的红细胞，它通过改变血红蛋白的氧亲和力而发挥作用：



2,3－二磷酸甘油酸（BPG）

这个多聚阴离子化合物在生理条件下携带 5 个负电荷，并结合在脱氧血红蛋白的中心腔(β－β裂隙)，与β链上的阳离子基团形成盐键（图 5－14）。在氧合血红蛋白中，该腔太小不能容纳 BPG。BPG 和氧的结合是互为特异的，BPG 结合后可降低血红蛋白的氧亲和力（试比较，图 5－13 中，在 pH7.6 及 BPG 存在时的离解曲线与标记“无 BPG”时的离解曲线）。

问题：在高海拔红细胞中的 BPG 浓度可增加 50%（4000 米，两天后）。这如何能协助适应低氧分压？

由于 BPG 浓度增加，血红蛋白的氧亲和力降低，可使更多的氧从血液释放到组织。这抵消了降低的动脉氧浓度。

---

pH 和 CO_2

快速代谢的组织需要增加氧的水平，因此，就要求氧合血红蛋白释放更多的氧到这些组织的细胞。在快速代谢的组织中，来自燃料（如：葡萄糖）氧化的 CO_2 快速堆积。这导致质子浓度的增加（pH 下降），反应式如下：

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

脱氧血红蛋白与氧合血红蛋白相比对质子有较高的亲和力，因此，质子的结合与氧的结合相互竞争（在不同的位点）：

$$Hb(O_2)_4 + 2H^+ \rightleftharpoons Hb(H^+)_2 + 4O_2$$

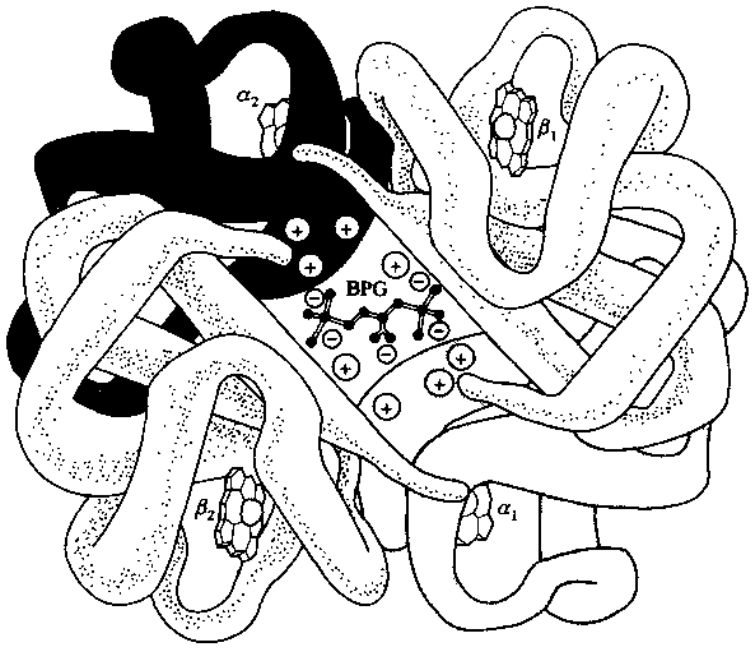


图 5-14 脱氧血红蛋白的 β-β 裂隙中2,3-BPG 的结合

这种影响称为 Bohr 效应，源自脱氧血红蛋白中解离基团的稍高的 pK_a。一个这样的基团是 β146 位的组氨酸，在脱氧血红蛋白中由于它靠近天冬氨酸使其 pK_a 增高，这就导致了它对质子的亲和力增加。在氧合血红蛋白中，由于几何学的变化，β146 组氨酸是游离的，并具有更为正常的 pK_a。pH 由 7.6 降到 7.2，这可导致释放到组织中的氧量成倍增加（图 5-13）。在肺中，氧张力很高，上述两个反应在一定程度上被反转，导致 CO_2 的释放。

尽管在血液中多数的 CO_2 是以 HCO_3^- 的形式被运输的，但也有一些与血红蛋白结合并作为变构效应物而发挥作用（第 9 章）。CO_2 与脱氧血红蛋白中未解离的 α-氨基发生反应，形成氨基甲酸；氨基甲酸可形成盐键，稳定血红蛋白的紧密结构：

$$Hb-NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons Hb-NHCOO^- + H^+$$

总之，血红蛋白亚单位之间的相互作用使氧的释放灵敏地适应生理需要。变构效应物 BPG，H^+ 和 CO_2 都是通过增加亚单位相互作用的强度而降低血红蛋白对氧的亲和力。

5.5 细胞外基质

在多细胞有机体中，细胞之间的空间大部分被相互作用的大分子的复杂网络所占据，它们构成了细胞外基质。这些基质包绕着，支撑着和调节着细胞的行为，如：分泌细胞外基质的成纤维细胞。基质与这些细胞共同构成了结缔组织。

细胞外基质由蛋白多糖和水形成的胶状基础物质中的纤维状蛋白质构成，如：胶原蛋白和弹性蛋白。其他蛋白质，如：纤连蛋白，在将基质成分相互结合方面具有特殊的作用。在钙化的组织中，一种羟磷灰石结晶[$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$]填充物取代了基础物质，而具有较高的承载能力。结缔组织的数量和大分子的组成成分，器官之间的差异较大。这导致形状、功能和生理性质巨大的不同（把大理石样的骨组织和绳索样的筋腱相比较；见表 5.1）。

表 5.1　结缔组织的近似组成（干重*）/%

	羟磷灰石	胶原蛋白	弹性蛋白	蛋白多糖
骨	80	19	0	1
软骨	0	50	0	50
腱	0	90	9	1
皮肤	0	50	5	45
韧带	0	23	75	2

* 骨中水分低（－10%），但其他组织高（－70%）。

胶原蛋白

结构

胶原蛋白是一类广泛分布的蛋白质；在哺乳动物中，它占身体总蛋白质的 25% 还要多。典型的胶原蛋白分子由硬的，不可伸展的，三股螺旋构成（第 4 章）。现在，已有 25 个起源不同的单独多肽链被了解，并且这些三联体组合形成 15 个类型的胶原蛋白（表 5.2）。这些当中，I 型的分布最广，也是被研究最充分的一种类型。它有 3 个 α 链，每个的分子质量为 95 000Da，由 1 000 个氨基酸构成，甘氨酸占 1/3，脯氨酸占 1/5。早期的研究者们将胶原蛋白变性形成明胶，并发现了相对分子质量约为 100 000，200 000 和 300 000Da 的分子系列，他们分别将其称为 α、β 和 γ 链。在此过程中，发现 β 链是二聚体，γ 链是 α 链的三聚体，但原有的名称仍然保留。

表 5.2　胶原蛋白的类型和性质

类型	链名称，三联体组成和长度（估计）/nm	结构形状	分布
I	2α1（I）和 1α2（I）；300	有 67 nm 带的宽纤维	最广泛；存在于皮肤、骨、腱和角膜
II	3α1（II）；300	有 67 nm 带的小纤维	广泛；存在于软骨、玻璃体液和椎间盘
III	3α1（III）；300	有 67 nm 带的小的网硬蛋白纤维	广泛；存在于皮肤、血管和内脏器官
IV	2α1（IV）和 1α2（IV）；390	非纤维交联网络	存在于所有的基膜（许多器官的内皮下层）
V	α1（V），α2（V），α3（V）；390	小纤维，常与 I 型结合	广泛存在于间质组织
VI	α1（VI），α2（VI），α3（VI）；150	有 100 nm 带与 I 型	大多数间质组织结合的纤维
VII	3α1（VII）；450	侧向装配的末端-末端二聚体	基质和基膜间的锚定纤维
IX	α1（IX），α2（IX），α3（IX）；200	与 I 型侧向装配的与糖胺聚糖集合	小软骨蛋白
X	3α1（X）；150	薄片状	过度生长的或矿化的软骨

问题：通过什么过程三个单独的 α 链排列形成规则的三联体螺旋？

单独链是作为前胶原 α 链被合成的，该前胶原链的分子质量为 150 000Da 并且在氨基和羧基末端分别有额外的伸展肽。从三个 α 链的氨基和羧基末端区域分别折叠形成球状结构，该结构相互作用引导形成三联体螺旋。链内二硫键稳定着羧基末端区域，三联体螺旋从该区域进一步盘曲（图 5－15）。

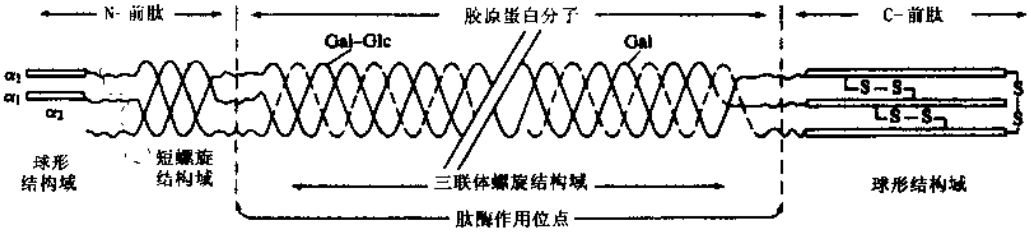


图 5－15　I 型前胶原蛋白模型

问题：胶原蛋白较为特殊的地方是它含有羟脯氨酸和羟赖氨酸残基。因为，这些氨基酸不能被直接组入多肽链中，那么，在胶原蛋白中它们是如何形成的？

脯氨酰羟化酶催化脯氨酸残基（位于前 α 链中重复甘氨酸残基的前面）羟化：

$$\text{-脯氨酰甘氨酰-} + 2\text{-酮戊二酸} \xrightarrow[\text{抗坏血酸}]{Fe^{2+}} \text{-羟基脯氨酰甘氨酰-} + \text{琥珀酸} + CO_2 + H^+$$

赖氨酰羟化酶以同样的方式作用于赖氨酸残基。注意：胶原蛋白的三联体螺旋部分由 $(x\text{-}y\text{-Gly})_n$ 构成，x 常为脯氨酸，y 通常为羟脯氨酸。

问题：在由缺乏抗坏血酸（维生素 C）导致的坏血病中，皮肤和血管变的非常脆弱。这是为什么？

没有抗坏血酸，赖氨酸和脯氨酸的羟化不能进行。这有三种影响：①阻止与羟脯氨酸羟基有关的链内氢键的形成，导致三联体螺旋的稳定性降低。②阻止糖基化作用，该作用像其他的将葡萄糖加到半乳糖上那样，将半乳糖单元加到羟赖氨酸残基上。③限制成熟胶原蛋白分子的广泛交联（图 5－18）。大多数的非羟化的前 α 链在细胞中被降解。

问题：一旦前胶原蛋白分子被羟化，糖基化、以及盘曲成三联体螺旋，它如何形成更高层次的结构？

前胶原分子从细胞分泌出来，伸展的前肽被两个特异的前胶原蛋白肽酶切除，形成原胶原蛋白分子。该肽（M_r = 20 000 和 35 000）的去除导致原胶原蛋白分子自我装配成原纤维。这种装配被细胞和其他细胞外成分控制着其在某种范围，并形成存在于胶原蛋白纤维中极具多样性的结构。

胶原蛋白纤维固定，用重金属试剂染色；电镜观察显示：间隔 67 nm 的明暗交叉的带（图 5－16）。这来自重金属在缺口区域的堆积而形成的染色深的带。单个原胶原分子装配的方式是：邻近分子相互交错，即，纵向移位约其长度（67 nm）的 1/4，在每个分子末端之

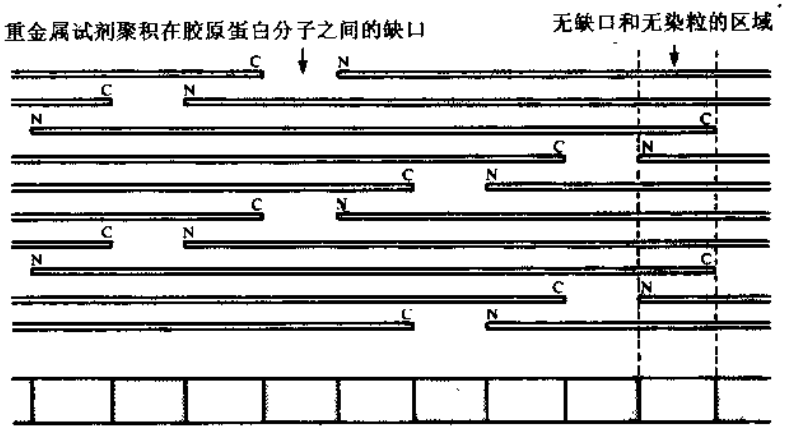


图 5－16　示意图显示：原胶原蛋白分子交错排布
形成磷钨酸负染的交替带

间留下一个缺口。

这种原胶原分子移位 67 nm 的装配是由多肽链上以 67 nm 周期重复存在的带电和不带电的残基簇所形成的。因此，当原胶原蛋白分子被移位多个 67 nm 后，最大数量的分子内相互作（静电的或疏水的）用就形成了。

然而，原胶原分子是如何以四交错排列三维包装成桶状的原纤维的，目前还不清楚。一个被广泛看好的模型是：以 67 nm 交错模式聚在一起的五个原胶原分子一组构成的五聚微纤维（图 5－17）。

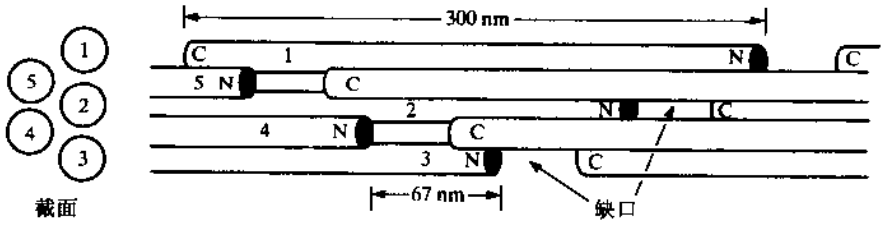


图 5－17　可能的模型：以五聚微纤维形式的胶原蛋白分子的三维包装排布

胶原蛋白原纤维的排布和大小各组织之间有明显的不同，直径范围是：10 ~ 300 nm，包装形式从杂乱无章（如：哺乳动物皮肤中）到严格的平行束（如：腱中）。

胶原蛋白的交联

胶原蛋白原纤维通过形成交联被进一步加强，以抵抗高强度的张力。共价交联可以在原胶原蛋白分子内形成，也可在不同的分子之间形成。第一步骤是赖氨酸残基的 ε－氨基的氧化脱氨基作用，形成醛赖氨酸的醛基（图 5-18）。这些高反应的醛自然地相互之间或与赖氨酸残基进行反应。

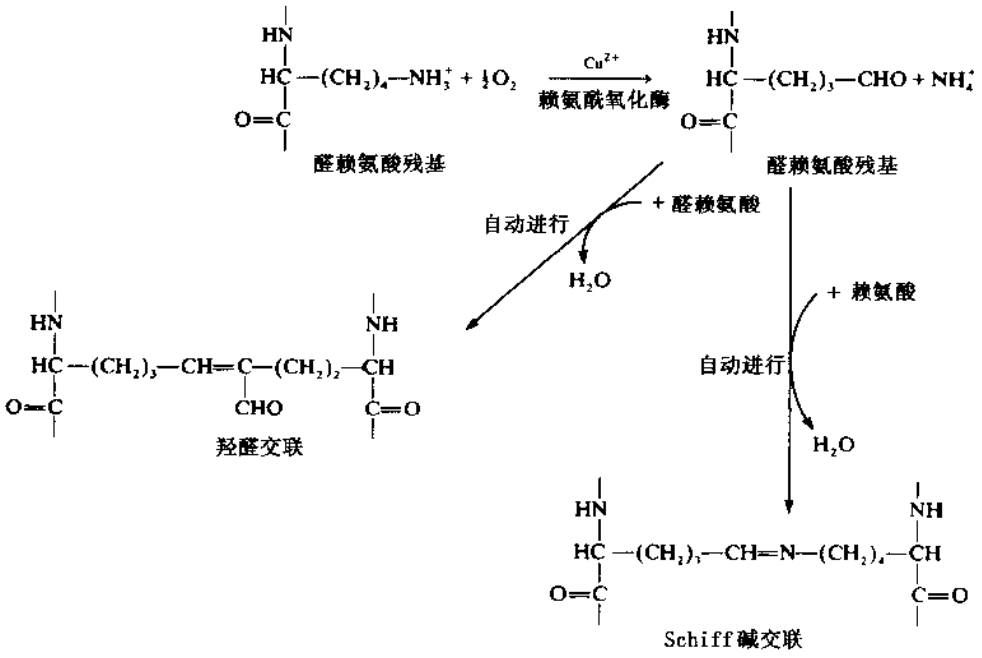


图 5－18　胶原蛋白分子中形成交联的反应

胶原蛋白 I、II、III、V 和 XI 型形成纤维结构。其他的类型常含有非螺旋区域，但全都聚集形成各种各样的超分子结构，而且形状也各不相同（表 5.2）。

例 5.11

Ⅳ型胶原蛋白分泌形式在C端含有一个球形区域，并在接近N端的三联体形中有一个弯曲。它聚合时，不需要任何加工过程，以及不进行侧向结合，但是，它仍然聚合成二维的片层样网络。非对称体的单体聚集只是通过其相同的末端彼此聚合；两个单体的球形区域相互结合在一起，而四个单体通过其N端三联体螺旋聚集在一起（图5-19）。

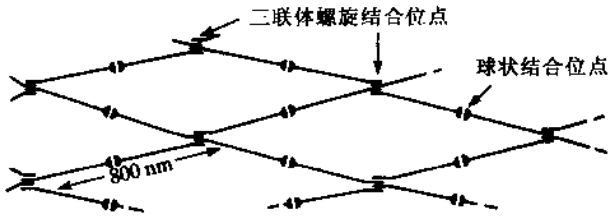
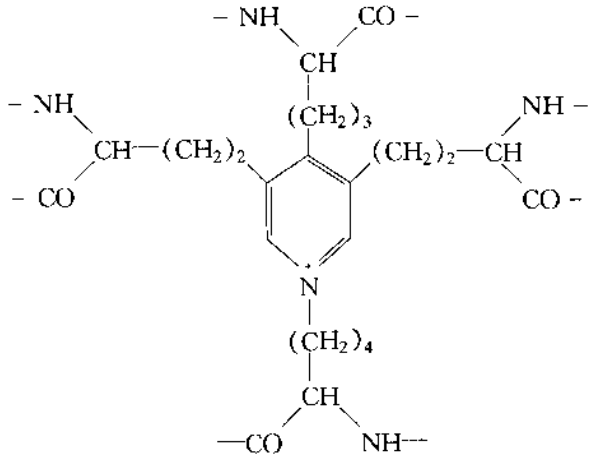


图5-19 基膜中Ⅳ型胶原蛋白聚合的模式模型

弹性蛋白

细胞外基质中其他的主要蛋白质是弹性蛋白质，它是弹性纤维的主要成分，存在于韧带，大动脉和肺组织中。合成和脯氨酸部分羟化后，72kDa原弹性蛋白分子被分泌到基质中。这个蛋白质富含非极性氨基酸，并含有重复序列，如：(Val-Pro-Gly-Val-Gly)。这些部分形成无定形的，无规盘曲的结构，带有频繁的反向回转。其他重复的序列是富含丙氨酸及其配对的赖氨酸残基，如：-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Lys-Ala。赖氨酰氧化酶的作用形成醛赖氨酸，在导致三个这种被修饰的残基与一个赖氨酸残基聚集成杂环复合物氨基酸——锁链素，它可交联两个或甚至三个链，形成高度交联的网络。



锁链素残基

例 5.12

弹性蛋白不是真正的橡胶，因为它不能自我润滑。它只有在水存在的情况下才具有弹性性质。在静止状态下，弹性蛋白折叠紧密，通过非极性残基之间的疏水相互作用使其稳定；这被称为加了油的螺旋。在拉伸状态下，这些疏水相互作用被破坏，并且非极性残基暴露于水。这种构象在热力学上是不稳定的，一旦拉伸力去除，弹性蛋白重新盘曲成其静止状态。

无定形的弹性蛋白被组织成弹性纤维，并且，每个10 nm纤维包绕着微原纤维鞘。鞘的主要成分是糖蛋白——原纤蛋白，其基因突变可引起Marfan综合征。

蛋白聚糖

细胞外基质的基本物质是高度水合的胶，含有大的多聚阴离子的蛋白聚糖，它含有

95%的多糖和5%的蛋白质。多糖链由重复的二糖单元构成，称为糖胺聚糖，因为半数的二糖是氨基糖的衍生物——*N*-乙酰葡萄糖胺或*N*-乙酰半乳糖胺；另外一半是带有负电荷的糖醛酸，如：葡糖醛酸（第2章）。

例5.13

透明质是单个的，非常长的糖胺聚糖链，该分子具有500个到数千个重复二糖单位，例如：$[\beta\text{-}(1\rightarrow4)\text{-GlcA}\text{-}\beta\text{-}(1\rightarrow3)\text{-GlcNAc}\text{-}\beta\text{-}(1\rightarrow4)]_n$（图5-20）。这些分子的分子质量范围是：$0.2\times10^6$到$10\times10^6$，它们并不与蛋白质共价相联。因为羧基的缘故，在中性pH值时，这种物质带有大量的负电荷。它常被称为透明质酸，或更确切地称为透明质酸盐。

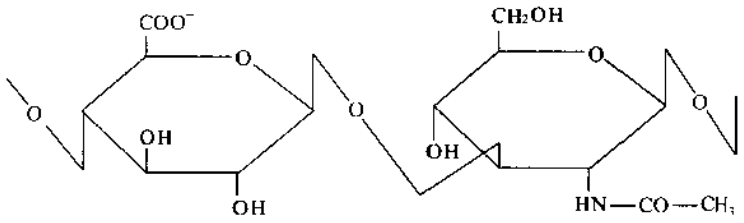


图5-20　透明质重复二糖的结构式

蛋白聚糖的的核心蛋白质异常的大（$M_r=30\ 0000$），它有一个球形的头（$M_r=75\ 000$）和一个富含丝氨酸和苏氨酸的长尾。糖胺聚糖通过寡糖键与这些羟基氨基酸共价相联（图5-21）。在合成过程中，通过一个特异的糖基转移酶单糖一次一个地被加上；在链的延伸过程中，通常在氨基糖的羟基上加上硫酸基团，增加该分子的负电荷。在软骨中，最丰富的糖胺聚糖是硫酸软骨素（$M_r=10\ 000\sim30\ 000$），并且可有100多个这样的链与核心蛋白质相联。硫酸化可发生在半乳糖胺的4′或6′羟基上。

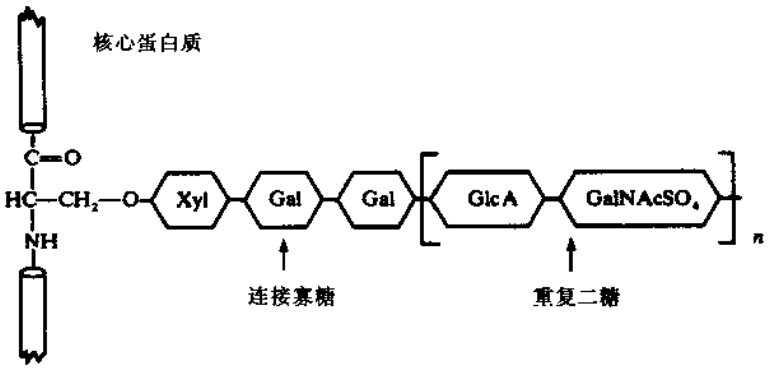


图5-21　糖胺聚糖硫酸软骨素和核心蛋白质的丝氨酸残基之间联接的图示

例5.14

与硫酸软骨素一样，其他带有短链的糖胺聚糖（如：硫酸角质素）也存在于软骨组织中（图5-22）。那些与存在于糖蛋白中相似的N连接的寡糖也可存在。注意，其他组织（如：椎间盘或角膜）中的硫酸角质素具有较长的链（$M_r=10\ 000\sim25\ 000$），并且可具有不同的寡糖与核心蛋白质相联。

在透明质存在的情况下，对于大多数的软骨蛋白聚糖仍可进一步地装配聚集成庞大的复合物，该复合物可含有50个蛋白聚糖单位，总分子量约为10^8Da。沿着透明质的长轴，核心蛋白质的球形头部与5个二糖单位的片段相互作用。通过连接蛋白质（$M_r=50\ 000$）与透明质和核心蛋白质相结合稳定这种非共价的相互作用（图5-23）。

蛋白聚糖的生理性质几乎全部基于糖胺聚糖成分；核心蛋白质的作用主要是作为空间的

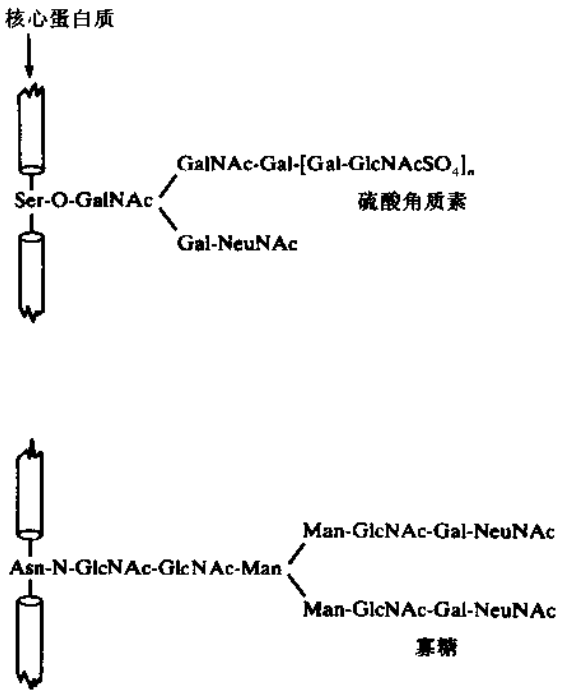


图 5－22　存在于软骨中的额外连接的碳水化合物

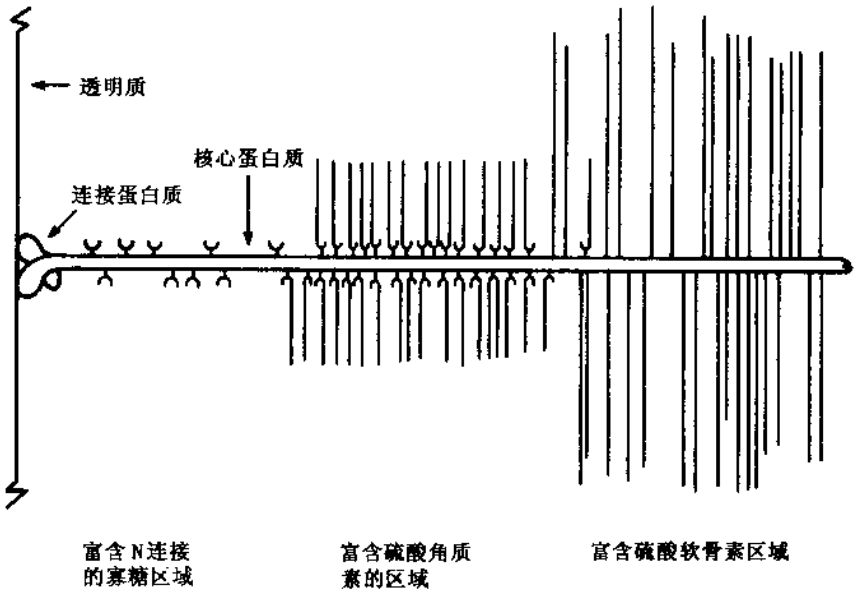


图 5－23　软骨中蛋白聚糖聚合的部分

组织者。糖胺聚糖链的数量和长度变化较大。高密度的负电荷导致静电相斥，因此，糖胺聚糖链充分伸展和分离形成瓶刷样的结构（图 5－24），这种结构所占的体积相当大。糖胺聚糖的亲水基团结合并固定大量的水分子；负电荷吸引阳离子。这两个效应形成膨胀压力或膨压。

例 5.15

透明质是糖胺聚糖中研究得最多的，也是最大的。在水溶液中，它形成无规的盘曲，并占据庞大的区域，其体积中充满了被固定的水，而且一些小分子和离子可以进入该体积中，

但大的则进不去。在0.01%的溶液中，透明质区域将占据水的所有体积；在高浓度时，透明质分子将渗透到邻近的区域，形成黏度较大的溶液，该溶液具有润滑的性质，这是关节中需要的。

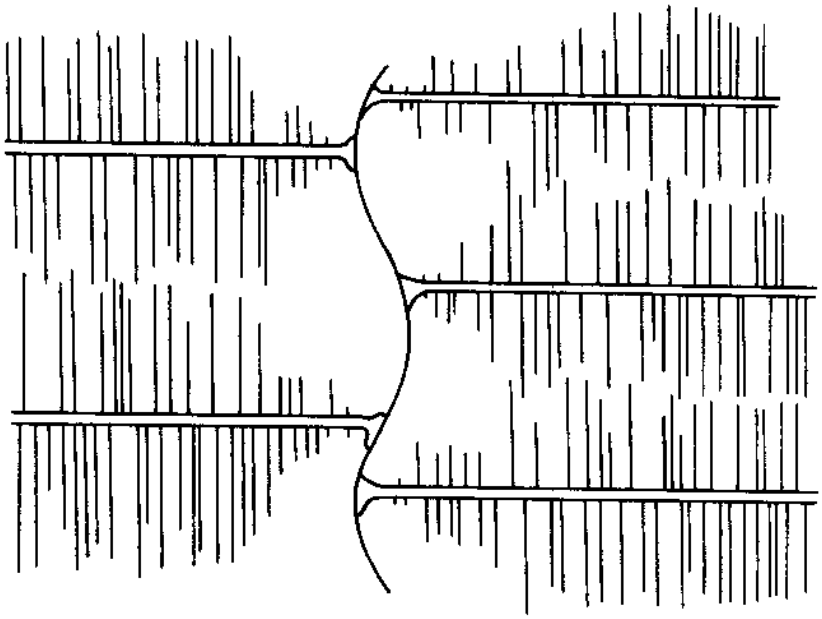


图5-24　蛋白聚糖聚集的部分，示瓶刷样结构

糖胺聚糖的空间填充特性在形态发生过程中是非常重要的，特别是在骨组织的发育过程中。在这些发育过程中，透明质的存在将促进细胞的迁移。这个效应可通过透明质酶去除透明质，以及通过用聚集的蛋白聚糖将其替换而被终止。

问题：蛋白聚糖的功能是什么？

蛋白聚糖大的体积/质量的比值（基于其吸引和保留大量水的能力）在细胞外基质中形成膨胀渗透压，或膨压，以抵抗压缩力。这可在关节软骨和椎间盘中清楚地被证明。在退行性疾病（如：关节炎）中，蛋白聚糖被部分的消耗和解离，导致组织弹性的发生变化。蛋白聚糖的多聚阴离子瓶刷结构产生一个过滤效应，因此，大分子通过结缔组织的扩散被限制，而小分子（特别是阴离子）甚至可呈现出扩散增强的状态。其他的蛋白聚糖要小的多，并且只含少量（1到10个）的糖胺聚糖链。其中许多是质膜的整合成分，它们在膜上结合并调节各种分泌的蛋白质，还可作为几种生长因子的共同受体。

纤连蛋白

对于细胞基质的几个其他蛋白质成分，了解最多的是纤连蛋白。这个糖蛋白是杂二聚体，由非常小的，但不相同的，被二硫键联结的2个多肽链构成（M_r=220 000）。它有几种形式：作为细胞（如：成纤维细胞）表面的结合复合物；作为细胞外空间大的聚集体；作为血浆中所谓冷不溶球蛋白（即：在0℃易形成沉淀）的一个修饰形式。

纤连蛋白是一个多功能蛋白质，由一系列由柔性片段（对蛋白水解敏感）连接球形结构域构成。这些结构域携带着细胞外基质成分和细胞表面的结合位点（图5-25）。纤连蛋白可形成多种相互作用，这种作用对组织稳定状态是重要的。例如，硫酸化的糖胺聚糖可增加

纤连蛋白与胶原蛋白结合的速度，由此增加该复合物的稳定性，使其沉淀并在基质中形成更大的聚集。

图 5-25 图示纤连蛋白的结构域：结构域 A 与肝素和纤维蛋白结合；结构域 B 与胶原蛋白结合；结构域 C 与细胞表面结合；结构域 D 与肝素结合

例 5.16

纤连蛋白的一个重要功能是参与细胞的附着。纤连蛋白形成网络使细胞与细胞外基质（尤其是胶原蛋白）连接，固定细胞的位置。与细胞的连接是通过膜蛋白（整连蛋白）而实现的，该整连蛋白与细胞骨架相联。纤连蛋白中结合整连蛋白所需的最小结构是序列 Arg-Gly-Asp（RGD），该序列位于该蛋白质单位表面环的最顶端。转化的细胞产生较少的的纤连蛋白而不能附着。把纤连蛋白加到这种细胞的培养基中将引起附着，并且该细胞可呈现更为正常的外观。转移癌细胞缺乏纤连蛋白，或导致其蛋白水解断裂。

结构研究显示：纤连蛋白由至少三种类型的单位（内部氨基酸序列同源性）构成，它们已在其他几种蛋白质的序列中发现。另外两个附着糖蛋白最近也被描述，它们的性质及其与纤连蛋白的比较列入表 5.3。

表 5.3 附着蛋白质的比较

性质	纤连蛋白	层黏连蛋白	软骨黏连蛋白
分子质量	440 000	820 000	约 170 000
亚单位	2×220 000	2×200 000	3×约 55 000
		1×400 000	
碳水化合物含量	5%～9%	12%～15%	约 8%
形状	伸展的 V 型	十字型；	紧密的
		3 个长臂，1 个短臂	
组织分布	纤维结缔组织	基膜	软骨，玻璃体
胶原蛋白结合	I～V 型，	IV 型	II 型
	III 和 I 型最佳		
糖胺聚糖结合	肝素、硫酸类肝素	硫酸类肝素、肝素	硫酸软骨素、肝素
细胞结合	成纤维细胞	上皮和内皮细胞	软骨细胞

5.6 细胞骨架

存在与真核细胞质中的蛋白质丝的复杂网络被称为细胞骨架。某些重要的也是研究得较清楚的功能有：① 维持细胞适宜的形态并增强质膜抵抗裂解和囊化；② 调节细胞的形态；③ 协助细胞迁移（细胞运动），如：巨噬细胞和粒细胞向感染部位的移动；④ 大量物质在细胞中的运输，以及物质运输出细胞和运输进细胞。这些网络对于细胞稳态，感受和应答和发送信号等，是重要的。例如，在质膜发生的内吞作用使某些营养素和其他物质被摄入细

胞，包装进小囊泡。信号转导机制（第 6 章）控制着细胞对外界刺激的应答反应，该机制与内吞作用有关。在细胞内快速和慢速运输机制将营养素，细胞物质和信号分子分布到细胞内的相应区域。物质也可通过胞吐作用以囊泡的形式运出细胞。胞吐作用的特化形式——突触，使神经元之间可快速地进行信号传递。

细胞骨架中出现遗传错误或损伤是一些疾病的的主要原因，这些疾病包括：许多类型的溶血性贫血，Duchenne 和 Becker 肌萎缩。适当的细胞-细胞接触（由细胞骨架调控）在阻止细胞癌变方面有重要作用，确实许多类型的癌细胞出现异常的细胞骨架。

细胞骨架网络的重要特征是：基本成分可被组入细胞各个部分中的各种不同的结构中。某种网络可被拆散为细胞的一部分，而其他网络可由彼此相似的成分被构建起来。事实上，某些网络可在它们的一个末端进行构建，而同时在另一个末端被拆除。

微管，中等和细纤维

在大多数细胞的细胞骨架中通常存在三种主要类型的纤维丝。它们是：① 微管（直径为 25 nm），主要由微管蛋白构成；② 细纤维（或微丝，直径为 7 nm），主要由聚合的肌动蛋白构成；③ 中等纤维（直径为 10 nm），由几种相关蛋白质构成。微管蛋白和肌动蛋白是球蛋白，并且在进化上是高度保守的。这些纤维比中等纤维具有更多的动态性（见 5.1 节）。

所有这三种类型的纤维均是具有极性的螺旋杆状（即：它们具有化学上明显区别的“头部”和“尾部”）。除了具有稳定纤维作用的多种接触以外，还有额外的用于结合辅助蛋白质的多结合位点。这些辅助蛋白质：可调节纤维的装配和拆卸，可将纤维相互连接，可将纤维和包括膜在内的其他细胞成分相连接，可使纤维参与依赖能量的移动。

肌动蛋白纤维

肌动蛋白（M_r = 41 800）广泛分布于真核细胞中，是含量最丰富的蛋白质，通常占细胞总蛋白质的约 10%。这种蛋白质是高度保守的，如：黏菌肌动蛋白和兔肌肉肌动蛋白之间 375 个氨基酸中只有 17 个是不同的。单体的肌动蛋白通常称为球形肌动蛋白或 G 肌动蛋白，而聚合的纤维状的肌动蛋白则称为 F 肌动蛋白。

肌动蛋白含有二价阳离子（Ca^{2+} 或 Mg^{2+}）的结合位点，这些位点必须被占据，以便阻止该蛋白质的变性。它也可结合 ATP 或 ADP 和无机磷（Pi）。在体外，通过保持极低的离子强度使肌动蛋白维持 G 型。然而，在 ATP 或 ADP 存在的情况下提高盐的浓度，它能聚合成 F 型。

ADP 参与的聚合

ADP 参与的聚合过程示于图 5－26。当盐浓度升高时，在 F－肌动蛋白出现之前有一个特征的间隔时间，通常为数分钟。这个间隔源自这样的事实：在聚合发生之前必须形成有效的核（含 2～4 个单体）。该核是不稳定的，这可能是由于它们不存在全部亚单位-亚单位的接触（该接触稳定着纤维中的单体）（图 5－8）。一旦有效的核形成，聚合将从该核的两侧末端快速地进行。纤维可含有数百个肌动蛋白单体，每个均结合一个 ADP 分子。这个结构为右手双螺旋，每圈 13.5 个单体，为 36 nm 的螺旋重复结构。

肌动蛋白只有在其浓度超过临界浓度（Cc）时才发生聚合。因此在化学平衡时，G－肌动蛋白池保持其浓度与 Cc 相等。这个平衡是动态的；在一个临界浓度时肌动蛋白单体与纤维末端结合的速度与其解离的速度是相等的。如果系统被稀释，将有纤维上单体的净丢失，在 G－肌动蛋白浓度重新恢复为临界浓度之前，这种解离将不断地进行。

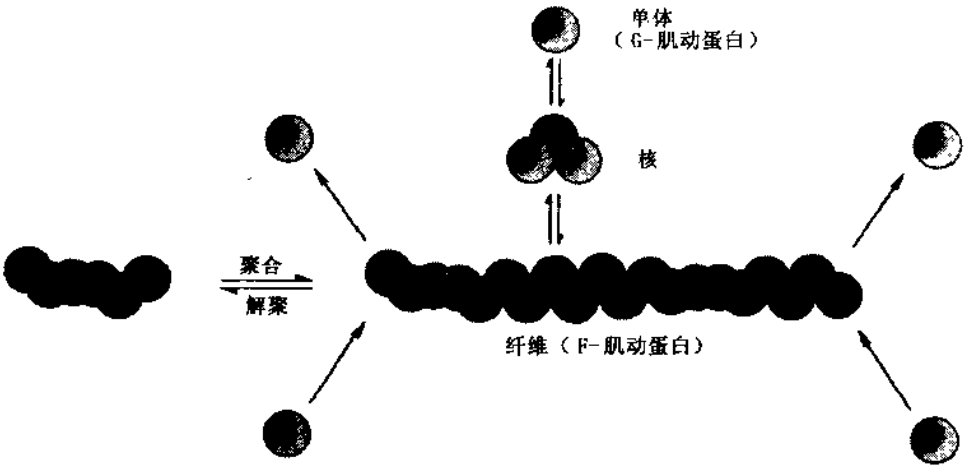


图 5-26　在 ADP 存在时肌动蛋白纤维的装配和拆卸

问题：肌动蛋白纤维的极性是如何确定的？

肌球蛋白（图 5-32）与纤维中每个肌动蛋白分子特异地相互作用，这导致该纤维被装饰成箭头图案，而且所有箭头指向同一个方向。基于这个图案，纤维的一个末端称为前端，而另一端称为尾端。

ATP 参与的聚合

与 ADP 相比，有 APT 参与的聚合更为复杂，但更具生理学意义。主要的差异是在 F-肌动蛋白的性质方面（图 5-27）。纤维的两个末端在动力学上是有区别的。当聚合起始，结合有 ATP 的单体加到尾端的速度要比加到前端的速度快。

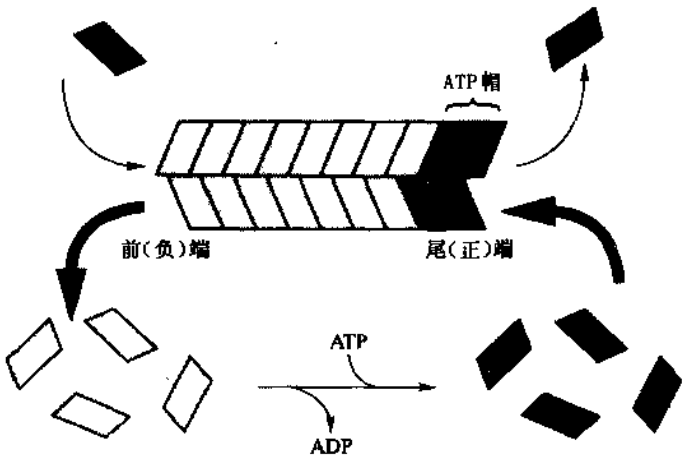


图 5-27　在 ATP 存在的情况下肌动蛋白纤维的轮转和稳态性质

在单体与纤维结合后不久，与每个单体结合的 ATP 被水解为 ADP + P_i。因此，大部分生长的纤维中肌动蛋白是带有 ADP 的，而在尾端有一个 ATP-肌动蛋白的“帽子”。ATP 单向的水解意味着在溶液中存在 ATP 时，该系统决不可能达到化学平衡。而稳态的实现是基于每个尾端具有不同的 Cc 值；尾端的 Cc 值比前端的 Cc 值要低得多。在稳态时 G-肌动蛋白的浓度介于每个末端 Cc 值之间。

由于在 Cc 方面的这些差异，以及由 ATP 水解所提供的能量，在稳态的纤维呈现一个繁重而单调的轮转状态。由于前（或负）端 Cc 高于 G-肌动蛋白的浓度，在此有单体（多为

ADP-肌动蛋白）的净丢失。由于尾（或正）端 Cc 低于 G-肌动蛋白的浓度，在此有 ATP 肌动蛋白的净增加。

从纤维释放的 ADP 肌动蛋白可在溶液中将 ADP 转换为 ATP，并重新与纤维结合。由于结构上的差异，纤维中的单体不能将其 ADP 转换为 ATP。

肌动蛋白结合蛋白质与肌动蛋白聚合的调控

尽管有很大比例的肌动蛋白集中于细胞皮层（质膜下的区域），但肌动蛋白可存在于大多数细胞的整个细胞质中。通过肌动蛋白结合蛋白质的作用，纤维可以各种非常不同的方式相互排布。这些蛋白质（及其调节物）和一系列其他机制调控着肌动蛋白的聚合，以及以肌动蛋白为基础的网络的稳态和动态。

基于它们在纤维上的结合位置和它们所起到的作用，肌动蛋白结合蛋白质可被分为几类；这些种类的定义和示例见图 5-28。

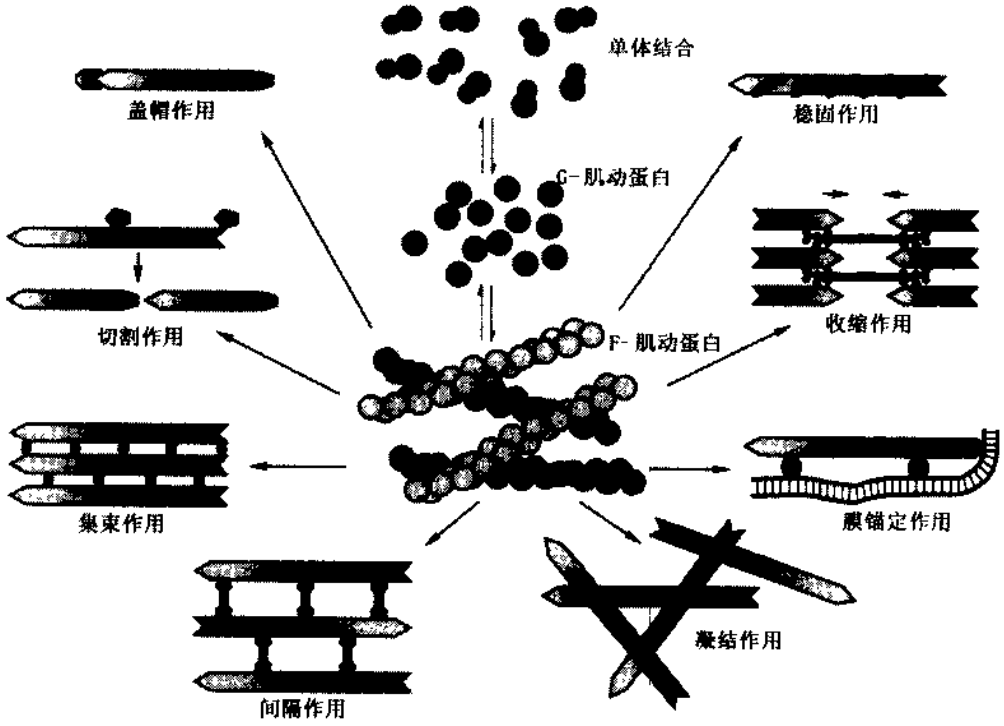


图 5-28　在肌动蛋白的组建方面不同类型的肌动蛋白结合蛋白质的作用

单体结合

已知有几个蛋白质可特异地与肌动蛋白单体结合。在大多数情况下，这些单体结合蛋白质（亦如预期的那样，抑制聚合）促进初步形成的纤维的解聚，并提高临界浓度 Cc。

例 5.17

在成纤维细胞及其他细胞中，单体肌动蛋白的浓度可高达 200μ mol/L，并可占细胞中总肌动蛋白的 50%。这与体外 ATP 肌动蛋白的临界浓度（1μmol/L 或少于 1μmol/L）形成强烈的对照。胸腺素（M_r=5 000）是负责在这些细胞中使单体肌动蛋白隔离的一种蛋白质。大的单体肌动蛋白池提供了快速装配以肌动蛋白为基础的细胞骨架网络的机会，而原封不动地保留先形成的肌动蛋白网络。

盖帽蛋白质

某些蛋白质可特异地与肌动蛋白纤维的前端或尾端结合。以这种方式将纤维盖帽可阻止（或延缓）从该末端单体的进一步延伸和解聚。

例 5.18

尾端盖帽蛋白质研究得最多的是凝溶胶蛋白（M_r - 90 000）。像许多肌动蛋白结合蛋白质一样，凝溶胶蛋白质对肌动蛋白纤维的亲和力被 Ca^{2+} 浓度的变化所调节，Ca^{2+} 浓度的变化基于以特殊方式对细胞进行的刺激。约 10^{-6} mol/L Ca^{2+} 浓度激活尾端的盖帽作用，并促进肌动蛋白的解聚，这是由于系统的可观察的临界浓度升高，接近于前端的 Cc。

切割蛋白质

已知有几种切割肌动蛋白纤维的蛋白质，它们可快速地将交联的 F-肌动蛋白凝胶转变为黏度较小的溶胶状态。这种凝胶到溶胶的转变通常被 Ca^{2+} 调节，并可发生于许多细胞的皮层中。

例 5.19

溶凝胶蛋白除了结合其尾端以外还可切割肌动蛋白纤维。这种切割活性依赖于 Ca^{2+}，并涉及肌动蛋白实际的弯曲程度。切割后，凝溶胶蛋白可通过与新生成的尾端结合来阻止纤维的再聚合。

侧向结合蛋白质

严格地与肌动蛋白纤维侧面（与盖帽的末端相对）结合的蛋白质可促进纤维的形成和降低临界浓度。在某些情况下，纤维的机械稳定性和硬度也会增加。

例 5.20

原肌球蛋白是一个卷曲螺旋的二聚体，由相同的 35kDa 亚单位构成。它结合在肌动蛋白纤维的沟槽中，跨距约为 7 个肌动蛋白亚单位，并促使纤维变硬和变直。该蛋白质协同结合于 F-肌动蛋白，意味着一旦一个分子结合，纤维的全长在其沟槽中将结合原肌球蛋白。

原肌球蛋白的功能在横纹肌肌动球蛋白收缩装置中被了解的最清楚，它是作为启动肌肉收缩机制的一部分（见下面的生力蛋白质部分）。在静息的肌肉中，原肌球蛋白被肌钙蛋白复合物（由三个多肽连构成）置于肌动蛋白沟槽以外。这阻止肌动蛋白与肌球蛋白分子的头部相互作用（图 5-29）。在神经刺激后钙从细胞内储存池释放到细胞质中，它可与肌钙蛋白 C 结合，改变肌钙蛋白 C 复合物的构象。原肌球蛋白可移向沟槽暴露出肌动蛋白上的肌球蛋白结合位点，使肌球蛋白与肌动蛋白结合。

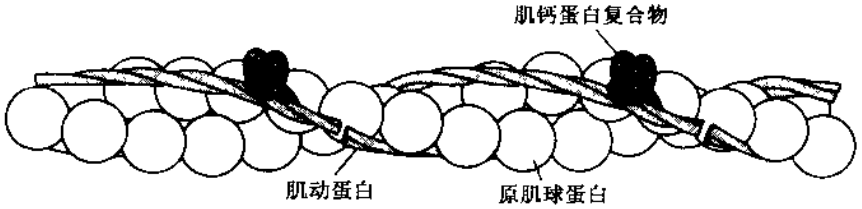


图 5-29 静息肌肉中 F-肌动蛋白，原肌球蛋白和肌钙蛋白之间的相互作用模式

交联蛋白质

交联蛋白质也结合在肌动蛋白纤维的侧面，但它可结合一个以上的纤维。这些蛋白质有几种重要的亚型，可形成不同的交联模式。集束蛋白质（如：绒毛蛋白和 α-辅肌动蛋白）将肌动蛋白纤维交联成为规则的束，在纤维之间有窄的沟槽（<40 nm）。间隔蛋白质（如：柔性的高度延伸的血影蛋白四聚体）导致更松散的纤维聚集，在纤维之间有 200 nm 的沟

槽。凝结交联物（如：细丝蛋白二聚体）将两个纤维在其重叠点上结合在一起，这与纤维之间形成的角度无关。

例 5.21

绒毛蛋白是集束蛋白质的一个例子。绒毛蛋白存在于微绒毛中，如：肠刷状缘细胞（图 5－30）。微绒毛可大量增加细胞表面的面积，这对于有效的进行吸收是重要的。每个微绒毛向肠腔内伸展 2 μm，由 20 个左右被绒毛蛋白（以及其他蛋白质）以规则的间隔聚集成束的肌动蛋白纤维来支撑。许多肌动蛋白网络中的共同特征是所有聚集成束的纤维以相同的方向起始于其尾端，而在这个例子中，接近于微绒毛尖部的位置是它们的终点。肌动蛋白纤维通过来自肌球蛋白－I 家族的第二个蛋白质（与收缩蛋白质肌球蛋白－II 有关）与质膜交联。这个蛋白质将其“头部”区域结合与纤维的侧面，把其“尾部”区域埋入膜中。

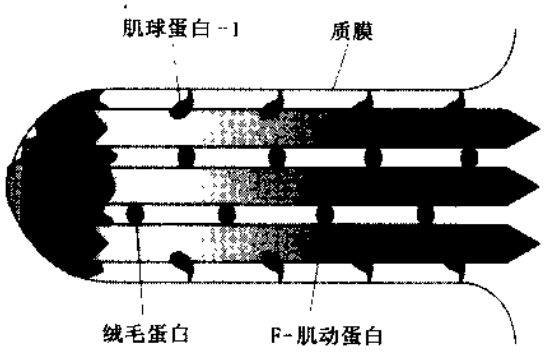


图 5－30

例 5.22

成熟的哺乳动物红细胞的细胞骨架是较为特殊的，如同其细胞是高度分化的细胞那样。在红细胞成熟的过程中，细胞骨架被限制为位于膜的细胞质面的二维网络（图 5－31）。这种柔性的耐用的膜骨架在细胞通过循环系统艰辛的途径中使细胞免于破裂，并且这种柔性足以使其挤过非常狭窄的毛细血管。

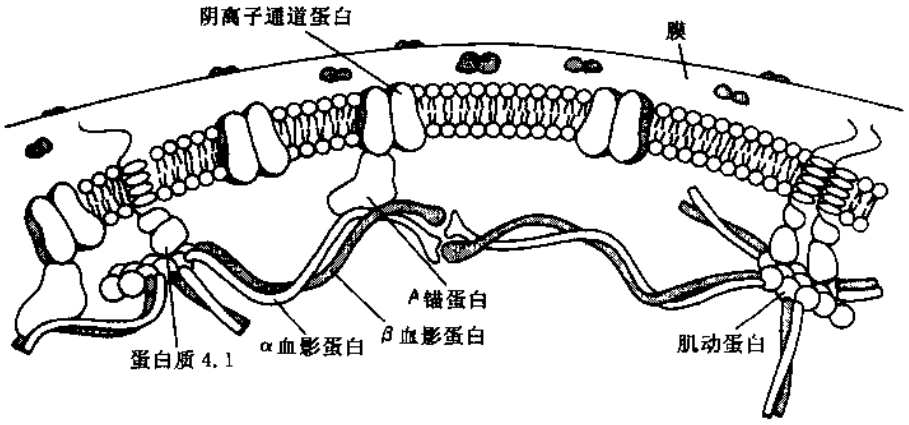


图 5－31　成熟哺乳动物红细胞的膜骨架

主要成分是血影蛋白杂四聚体（两个 α 链和两个 β 链），它是非常大的（1 052 kDa），高度伸展的柔性分子；它可使用在其末端的结合位点将肌动蛋白交联。蛋白质 4.1 加强血影蛋白和肌动蛋白之间的相互作用。与其他细胞不同，红细胞中的肌动蛋白组成的原丝只由约 15 个亚单位构成。平均每个原丝结合 6 个血影蛋白，形成大的六角组合格子。这个格子主要通过锚蛋白（与血影蛋白的 β 链和膜内的阴离子通道蛋白结合）与膜结合。

生力蛋白质

肌球蛋白－II（肌和其他细胞收缩装置的生力蛋白质）是第一个被描述和鉴定的肌动蛋白结合蛋白质。肌球蛋白原体（M_r≈520 000）由两个相同的重链（M_r＝220 000）和两对轻链（依其来源，M_r＝16 000～27 000）。每个重链含有一个球形的头部，该头部通过一个铰链区域与长的 α－螺旋尾部相连接。来自两个重链的尾部形成一个长150 nm的卷曲螺旋

(图 5－32)。轻链在每个头部的基部附近相联。

肌球蛋白原体可自我聚合形成粗纤维，这是通约 400 个肌球蛋白尾部的装配而完成的，其方式为相互并排包装，而肌球蛋白的头部螺旋排列以规则的间隔突出出来。粗纤维有两个极，在中部有一个 150 nm 的裸带，在此两套相反来源的肌球蛋白尾部结合在一起。这个区域的中心称为 M 线。该粗纤维形成了肌原纤维的部分。

肌原纤维也含有 F－肌动蛋白的细纤维，该纤维带有结合于沟槽中的原肌球蛋白的二聚体，并且每个原肌球蛋白二聚体结合一个肌钙蛋白。这些细纤维也排列为两极模式。所有的前端从 Z 盘（含有大量的蛋白质，包括：α－辅肌动蛋白）的每一边指向外面。α－辅肌动蛋白将肌动蛋白在其尾部聚集成束，并把它们牢固地固定在盘中。

肌原纤维的粗和细纤维部分地相互交叉，每个粗纤维被 6 个细纤维包绕。一个单独的收缩单位（肌节）被描述于图 5－32，它的直径为 1.5 μm 而长度为 2.2 μm。肌节的线性排布形成肌原纤维；这些肌原纤维平行排列，并贯穿肌细胞的全长（长至数厘米）。

在收缩过程中，每个肌原纤维的每个肌节中的粗和细纤维协调一致地相互滑动，而其长度并不改变。肌节缩短，粗和细纤维之间的相互穿插增加。这就是肌肉收缩的纤维滑动模型。

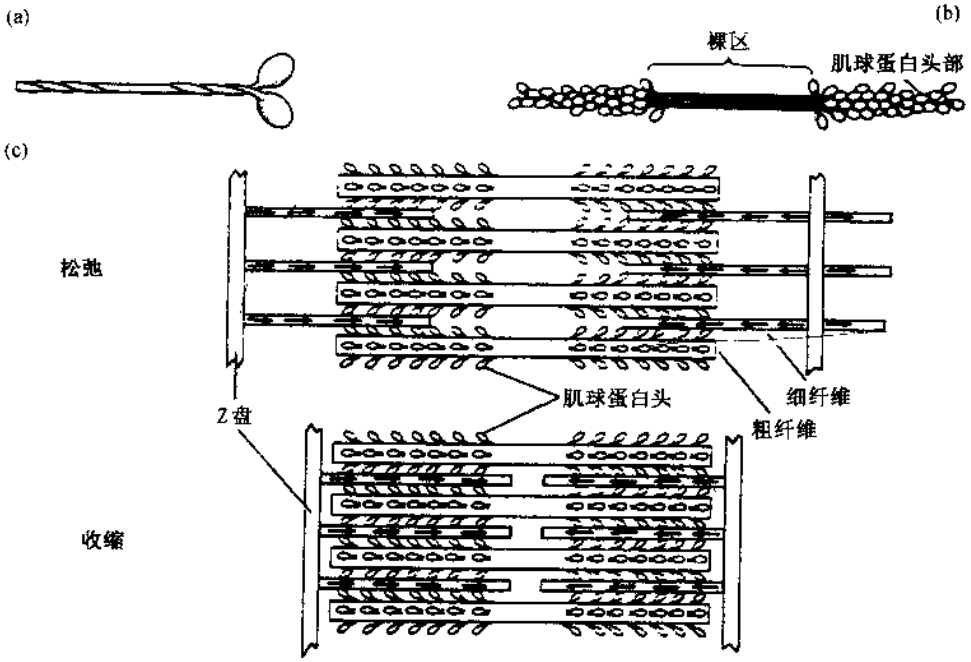


图 5－32 骨骼肌肌原纤维的成分：(a) 肌球蛋白；(b) 粗纤维；(c) 肌节的收缩。细纤维的极性以箭头表示

问题：通过什么机制肌球蛋白可在粗和细纤维之间形成机械力？

机械力是通过肌球蛋白头部与肌动蛋白循环地相互作用和水解 ATP 提供能量而形成的（图 5－33）。每个肌球蛋白头部可结合一个 ATP 分子。肌球蛋白是 ATP 酶。ATP 酶活性是组成型的，但是，在肌动蛋白存在时该活性可提高 200 倍。循环开始于肌球蛋白头部将与其结合的 ATP 水解为 ADP 和 P_i。在这种形式中，头部与肌动蛋白纤维结合，并使其产物释放，ADP 和 P_i，由此引起肌球蛋白头部周围的构象发生变化。头部向后拉，同时拽着肌动纤维向后。这是个有力的划动。然后，头部与肌动蛋白分离，结合新的 ATP 分子开始新的循环。在快速收缩过程中，每个循环为 0.2s。注意两个铰链的重要性，它们提供一个柔韧的移动。

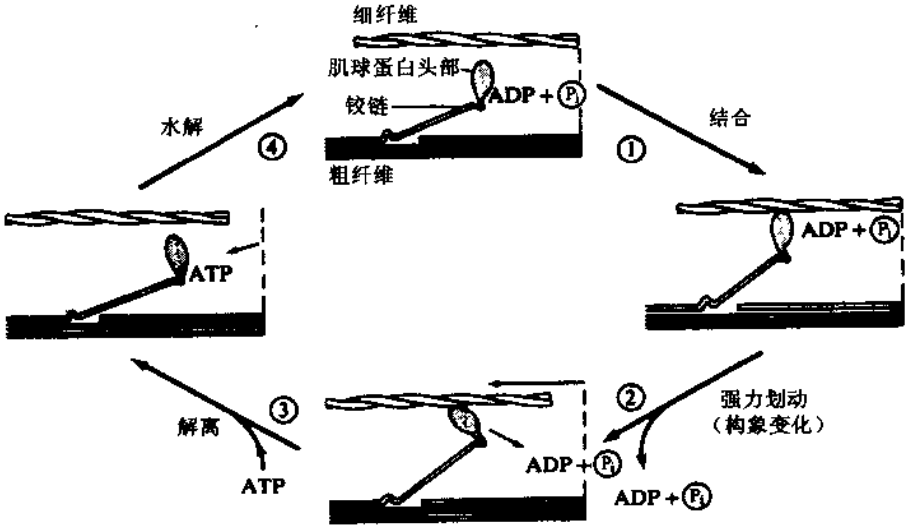


图 5－33　肌肉收缩循环的四个步骤，图示通过水解 ATP 驱动的肌球蛋白和肌动蛋白的聚合和解聚

问题：机械力的形成是如何起始和调节的？

Ca^{2+} 的增加（如：从 10^{-8}mol/L 到 10^{-5}mol/L）是触发因素。在横纹肌中，Ca^{2+} 是从内质网释放到细胞质中的，这是肌细胞由其附着的运动神经的刺激所诱导的。Ca^{2+} 与肌钙蛋白复合物相互作用，导致原肌球蛋白的移动使纤维上的肌球蛋白结合位点暴露出来（见例 5.21）。在平滑肌中，释放的 Ca^{2+} 间接地活化肌球蛋白轻链激酶，该酶可将肌球蛋白轻链磷酸化。因此，调控是在粗纤维的水平。在某些非肌细胞中，通过 Ca^{2+} 的调控是在肌球蛋白装配成纤维的这个水平。

在所有情况下，Ca^{2+} 浓度的下降（如：被泵回细胞内储存池）反转这个过程。值得注意的是收缩过程需要 ATP 持续的供应。当 ATP 被完全耗尽，强直发生。

问题：在肌节中是什么调节细纤维的长度和粗纤维的位置？

肌节中的细纤维长度相同。近年来，在肌节中发现两种蛋白质——伴肌动蛋白和原肌球调节蛋白。伴肌动蛋白是相当大的蛋白质，几乎全由多聚 35 残基肌动蛋白结合基原构成。伴肌动蛋白的长度是肌节细纤维的长度，它可通过微变规律调节细纤维的长度（图 5－4）。原肌球调节蛋白通过在纤维的前端盖帽来参与这个过程，盖帽可阻止其进一步延长，这也是前端盖帽蛋白的一个例子。

其他近来发现的蛋白质——肌联蛋白，也是相当的大并且是高度伸展的。肌联蛋白从 Z－盘延伸到粗纤维，在肌节中可起到将纤维定于中心的作用。

微管

微管是中空圆桶状结构，内径为 14 nm，外径为 25 nm。完整的圆桶含有 13 个平行的原丝，每个是头尾相联的杂二聚体的多聚体，形成杆状（图 5－34）。杂二聚体含有一个 α－和 β－微管蛋白亚单位，它们紧紧地结合在一起。这两个亚单位（每个 M_r = 50 000）是从独立的基因合成的，但是它们的氨基酸序列具有高度的同源性。

聚合作用，轮转和动态不稳定性

微管蛋白的聚合与激动蛋白具有许多相似之处。原体是微管蛋白杂二聚体。杂二聚体中

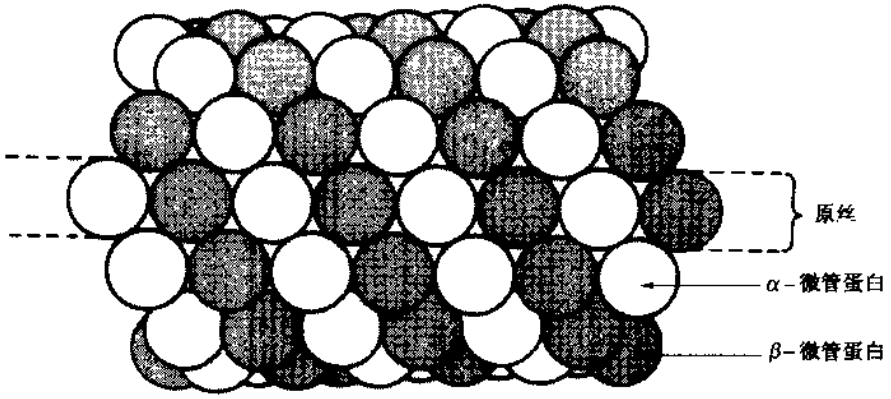


图 5-34 微管的短片段，图示微管蛋白二聚体组入原丝中

的每个亚单位可结合一个核苷酸；在这个例子中，是 GTP。有一个与成核作用相关的延缓期。一旦有效的核形成，“爆发”式的聚合可从核的两端进行。钙离子和低温（4℃）抑制聚合作用，而镁离子和高温（37℃）可刺激聚合。与肌动蛋白相似，微管是有极性的，并且从正端的聚合作用比负端要快 3 倍。聚合作用伴随着 GTP 的水解，这只发生在 β-微管蛋白上，而且发生在 α/β 原体与纤维结合时或以后不久。GTP 帽可存在于纤维的两个末端，而平均来看，在正端的帽要比负端的帽大一些。

在稳定状态，自由的杂二聚体池（表示临界浓度）与纤维同时存在。对于这些纤维，在正端的临界浓度比负端的低。因此，轮转可在负端形成原体的净丢失，而在正端形成净增加。然而，对于微管，轮转一般来讲要逊色得多，这是由于动态不稳定性所造成的。如果纤维在任何一端失去 GTP 帽，那么在该端的解聚将发生得非常快。因此，即使在稳定状态，某些纤维在一端或两端快速地缩短，而其他的纤维可在一端或两端快速地生长。动态不稳定性也发生在体内，并且这对于许多基于微管的网络正常的功能是重要的因素。

微管相关蛋白质（MAP）

MAP 可与肌动蛋白结合蛋白质相似的方式被分类。与肌动蛋白结合的相应部分相似，MAP 也可成核，盖帽，稳定和交联微管。在最近几年中，已有几种动力蛋白质被鉴别，它们与大量的基于微管的网络中的动力形成有关。与肌动蛋白结合蛋白质相似，MAP 也被标定于细胞的一定区域，作为组成性的或短暂的基础物质。这使得特化了的微管网络在特殊的位置被构建和执行其功能。某些 MAP 的功能和性质将在下述的例子中进行探索。

问题：微管在细胞中是如何分布的？

在几乎所有动物细胞的间期，大多数微管从中心体（靠近核的深染区域）向外放射状分布。中心体含有一对中心粒（小的圆桶状结构，含有微管和其他蛋白质）[图 5-36 (a)]。在中心粒对的周围是中心周围物质，它们与新微管形成的成核作用有关。因此，中心体被认为是一种类型的微管组织中心（MTOC）。放射状的微管，其正端指向细胞的周边，而其负端被稳定地包埋在中心体中。微管在体内保持着高度的动态性，其半衰期在数分钟的数量级。某些微管通过在其正端盖帽而增强稳定性，以此阻止解聚。

例 5.23

微管的中期组构具有许多作用，其中最重要的是快速地将细胞器和包裹入囊泡的物质运

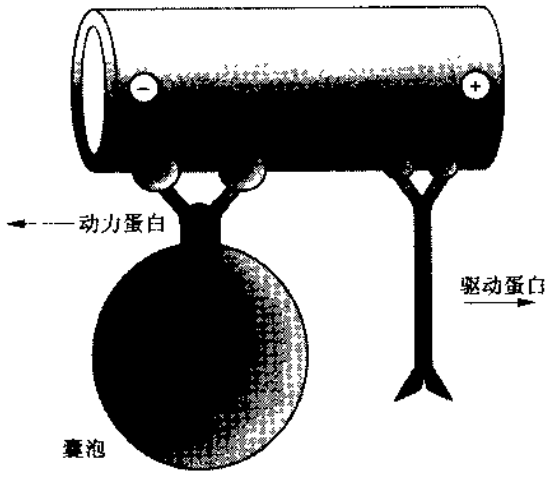


图 5－35　动力蛋白和驱动蛋白动力装置，以及它们与囊泡和微管的相互作用

输到细胞的各个部分。这个过程首先是在乌贼巨轴突中直接观察到的，被称为快速轴突运输。在高度伸展的细胞中，如：神经元，细胞器和蛋白质的简单扩散是相当的慢，这种快速运输机制可将重要的物质传送到细胞的远端部分，以及运回某些物质。轴突中小囊泡的顺行移动（即：从细胞体离开，向轴突微管的正端的移动）可快至每秒 5μm。逆行运输是这个速度的一半。

现在已知快速运输存在于几乎所有的动物细胞中。微管作为“高速公路”在发挥作用，大量的囊泡以及其他细胞器（如：线粒体）在它的上面移动。

问题：快速运输的机制是什么？

细胞中的快速运输需要载体（细胞器或囊泡），动力和燃料。动力可被分为两类：细胞质动力蛋白和驱动蛋白（图 5－35）。每个均以 ATP 作为燃料，将其水解为 ADP 和 Pi 而提供能量。动力装置可感觉到微管的极性；动力蛋白向负端驱动，而大多数驱动蛋白的驱动方向为正端。移动产生于 ATP 的循环水解，构象变化，以及与微管的可逆结合。

例 5.24

纤毛和鞭毛是稳定的微管结构，它们从特定的真核细胞的质膜突出出来。这些结构依赖于能量的摆动驱动物质在细胞表面移动或驱动细胞本身的移动。例如，输卵管头部细胞上的纤毛的鞭打样的运动将刚刚由卵巢释放的卵细胞拉进并沿着输卵管移动。精子鞭毛蛇样的摆动是这些细胞可以移动。

尽管纤毛和鞭毛的运动有某种程度的不同，但是，基于微管的鞭毛轴丝是它们的共同结

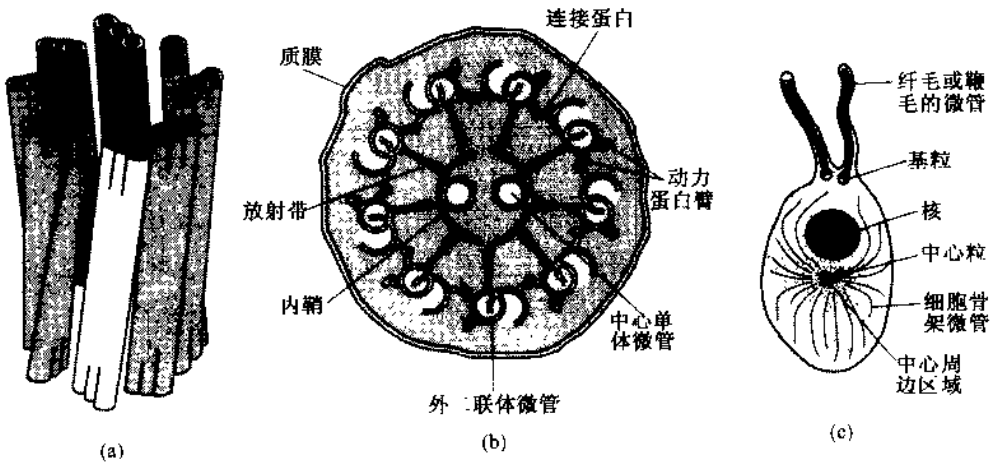


图 5－36　图示纤毛的中心粒，基粒和鞭毛轴丝。（a）中心粒/基粒，示 9 组三联体微管。（b）纤毛/鞭毛的截面，示“9＋2”排布的微管和鞭毛轴丝的辅助蛋白质。（c）示细胞的基粒和中心粒的组织作用

构：鞭毛轴丝是圆桶样结构（直径约为200 nm），由“9 + 2”排布的微管构成［图5－36(b)］。注意：两个中心微管是完整的，而9个二联体外微管中的每一个含有一个完整的（A管）和一个不完整的（B管），它们融合在一起。

大量的辅助蛋白质与鞭毛轴丝以规则的间隔相结合。每24 nm，纤毛动力蛋白（细胞质动力蛋白的一个三头异型体）从每个二联体的A管向相邻的二联体的B管伸展出成对的臂。在86 nm的间隔，连接蛋白联结着相邻的二联体。每29 nm，辐射带从外二联体向内突起朝向内鞘（其本身与中心微管对相联）。

若没有交联，动力蛋白的动力装置可容易地引起微管相互滑动，直到它们不再接触。交联限制滑动，在促进弯曲和周期性的鞭打方面具有重要作用，但其机制尚不清楚。

问题：鞭毛轴丝的结构是如何组构的？

鞭毛轴丝从被称为基粒（与中心体内中心粒的构造相似）的结构形成［图5－36(a)］。基粒由9组被蛋白质以规则间隔交联的微管三联体构成。没有中心微管，但某些截面中可以看到指向中心“轴”的辐射状蛋白质带。

每个鞭毛轴丝二联体由每个基体三联体的两个微管所形成。鞭毛轴丝的两个中心微管的生长是如何控制的？鞭毛和纤毛精确控制的长度是如何被监控的？这些均不清楚。

例5.25

有丝分裂期是细胞周期的高潮，在此期内，两个相同的子代细胞形成，每个携带着全部遗传物质。这个过程非常复杂，并且是动态的；在“典型”的细胞中这个过程可持续一个小时多一点儿。在这段时间内，一定要形成微管有丝分裂纺锤体，且染色体浓缩（前期）。然后，核膜崩解，染色体被微管俘获到纺锤体上（前中期）。在中期，纺锤体移动并将所有的染色体排列在中期板（在纺锤体两极之间的平面）。后期开始：每个染色体的两个姐妹染色质之间的连接断裂，姐妹染色质快速地向纺锤体相对的两极移动。两极分离。一旦到了极区，染色质去浓缩，每套被新的核膜包裹起来（末期）。通过胞质分裂形成两个新细胞；胞质分裂开始于后期末，涉及在纺锤体两极之间的中间位置质膜的内陷和分裂。

问题：在有丝分裂纺锤体中微管的来源是什么？

间期细胞的微管网络是去聚合的，并重新形成有丝分裂纺锤体。这需要两个MTOC，第一个是原有的中心体及其一对中心粒。第二个源自在间期的S和G_2期中中心粒的复制。在前期中，两对中心粒相互移动分开，包绕它们的中心周边物质具有成核作用和稳定微管的作用。这两个MTOC成为纺锤体的极点。

在有丝分裂纺锤体中有三种微管易被区分。极性微观在两极之间重叠（并可能相互作用），它与后期中将两极拉开有关。星型微管向所有的方向辐射，也与极点分离有关。动粒微管与特化了的蛋白质结构（动粒；位于每个染色体的着丝粒两侧）结合。这些微管与染色体移向中期板以及在后期姐妹染色质的分离有关。纺锤体中的微管是动态的，并只有几秒钟的半衰期。这对于动粒微管染色体的俘获方面是非常重要的。那些没与动粒结合的微管很快丢失，这是由于它们动力学的不稳定性所导致的快速解聚。那些击中靶点的新微管由于正端的盖帽而较为稳定。

问题：移动染色体和分离极点的力是如何形成的？

纺锤体含有大量的动力蛋白和驱动蛋白系列的动力装置（图5－37）。它们与动态不稳定性和微管的轮转，共同控制移以及染色体和极点的相应位置。纺锤体处于源自系列作用力的持续的张力状态下。

在中期，当所有的染色体均排列在中期板时，所有这些力量处于平衡状态。动粒中的动力蛋白装置试图沿着动粒微管将染色体拖回极点（即：负方向）。由于每个染色体含有两个动粒，而且每个面向不同

的极点，这种向两极的拖拉被抵消［图5 37（a）中的箭头所示］。至少有两个力同时参与将极点分离的过程。在极性微管重叠的部分，驱动蛋白装置将其尾部与微管的侧面结合，并使用其头部的这个装置向另外的正端驱动，在极点上施以一个推力。在直接远离纺锤体中心的星形微管，动力蛋白装置（可能与细胞皮层相联）在极点上施以一个拉力。在后期中，当姐妹染色质在着丝粒处分开，这种平衡消失［图5－37（b）］。动粒中的动力蛋白装置向极点驱动姐妹染色质。此处的速度可通过动粒微管的可控的解聚来调节。现在，两极可以分开，极性微管间的重叠部分缩短。在这些纤维的正端快速的聚合作用可完全丧失。

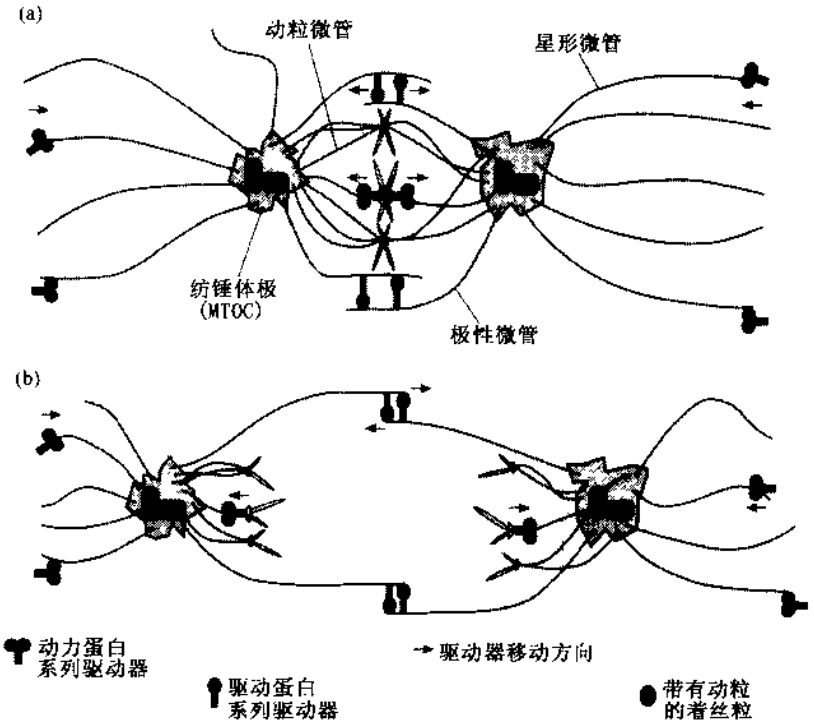


图5－37　图示（a）中期有丝分裂纺锤体，染色体排列在中期板；（b）在后期中姐妹染色质和极点分离

问题：胞质分裂如何发生？

胞质分裂起始于后期的某个时间。在质膜中与中期板相同的平面上裂沟开始形成。裂沟如何定位尚不清楚。基于收缩环（一个肌动球蛋白网络；为此目的而被特殊地装配，而后解散）的作用裂沟形成并加深。因此，该网络的稳定性与肌肉中的类似物有很大的不同。这些网络的动力学也是不同的（见题5.16）。

中等纤维

中等纤维是一系列强度好的，不溶的蛋白质纤维，直径为10 nm，存在于大多数真核细胞中。其亚单位（图5－38）的大小变化较大（M_r＝40 000～200 000），但是，在每个亚单位的中部，它们却具有一个共同的盘绕螺旋，α-螺旋区域。这个杆状的区域有恒定的长度，以及显著的序列同源性，在各种类型之间相同的氨基酸为30％～70％；它也是纤维结构的基础，约25个亚单位并排连接形成一个纤维的截面。末端球形区域是可变的片段，由此可将中等纤维分化为各种类型，并且它从纤维向细胞质突出，在细胞中起到一个尚不明了的作用。有5类中等纤维（表5.4），它们可通过生物化学，免疫学和分子生物学技术来区分。一般来讲，一种类型的细胞只含有一种类型的中等纤维。所有类型的中等纤维在细胞中起到

结构的作用，以此抵抗机械压力。

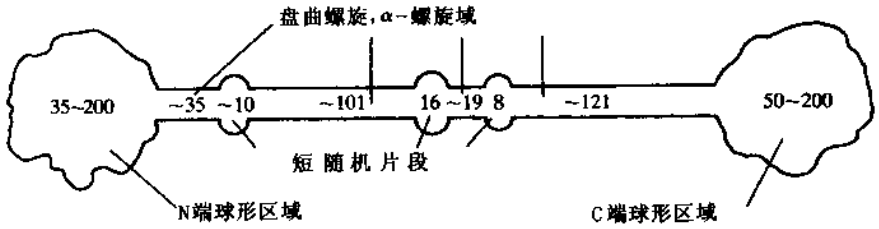


图 5-38 图示一个中等纤维的亚单位。(数字表示每个结构域中氨基酸残基的数量

表 5.4 脊椎动物细胞中中等纤维的分类

中等纤维	蛋白质成分	细胞类型
细胞角蛋白	多种：M_r = 40 000～70 000	上皮细胞
神经丝	主要三种：M_r = 68 000，145 000 和 220 000	神经元
波形蛋白	M_r = 55 000	间质，如：成纤维细胞
结蛋白	M_r = 53 000	肌细胞
胶质纤丝	M_r = 50 000	某些胶质细胞，如：星形细胞
核纤层蛋白	主要三种：M_r = 65 000～70 000	真核细胞核纤层

例 5.26

研究最多的而且最具多样性的中等纤维类型是细胞角蛋白，也称为前角蛋白，它通过二硫键而交联。通过还原，可从上皮细胞获得几种不同的多肽链，链的范围因组织不同而不同。从人类组织中已鉴定出 19 个不同的细胞角蛋白，每个均为不同的单独基因产物，并不是由不同的加工过程而形成的。有两种类型，酸性角蛋白和中性-碱性角蛋白，它们以 1∶1 的比例相互作用形成角蛋白纤维。通过形成跨越整个上皮层的连续纤维网络（提供张力强度）而在上皮细胞中起到重要的作用。通过铆钉样联接（点桥粒；作为角蛋白纤维的锚定点）固定细胞。角蛋白纤维在较高等动物硬的外保护覆盖物中含量丰富，并且伴随细胞的成熟及最终死亡，它们的交联将增加，形成角化的外皮肤层，指甲和头发。

一般来讲，中等纤维比 F-肌动蛋白和微管更为耐久，并且未聚合亚单位池非常小。而它们的装配和去装配由许多方式来调节，包括蛋白质水解和磷酸化。

例 5.27

支撑哺乳动物细胞核内膜的是中等纤维网络（称为核纤层，由核纤层蛋白构成）。有丝分裂的前期末，核膜崩解为囊泡，这是由核纤层蛋白在各种丝氨酸残基上的磷酸化所启动的。这使得核纤层去装配。在有丝分裂完成，核纤层蛋白去磷酸化使得每个新的子代细胞中的囊泡重新形成包裹着染色体的核膜。

问题解答

超分子结构的装配

5.1 一个多酶复合物有三个不同的催化活性，每个活性有 8 个位点。比较下列两种情况中形成缺陷型复合物的频度：(a) 该复合物在一个步骤中作为一个含有 8 000 个氨基酸残基的长多肽链被合成。(b) 该复合物通过三个步骤被构建。一、合成 24 个多肽链：8×200，8×300 和 8×500 个氨基酸残基。二、三个 3 种类型的链（每种各一个）构成三聚体。三、8 个三聚体装配成该复合物（设：在这两种情况下每个操作错误的频度为 10^{-5}，并且一个错误将导致彻底的废弃。）。

答：

(a) 组入错误氨基酸的概率是 $1/10^5$。因此，缺陷型复合物出现的频度是 $8\times10^3\times10^{-5}$，也就是每 100 个复合物中有 8 个是缺陷型的。

(b) 因为缺陷型多肽链不能形成二聚体而被废弃以及任何缺陷的二聚体将不被进一步装配，所以，缺陷型复合物的频度将与二聚体最后装配形成复合物所需的 7 个步骤有关，这个频度为 7×10^{-5}。因此，三步骤过程形成的缺陷型复合物要比单步骤过程少 1 000 倍；另外，所需的遗传信息也仅为 1/8。

蛋白质自我装配

5.2　二聚合反应 $2A \rightleftharpoons A_2$，在 $molL^{-1}$ 为单位刻度中的平衡常数为 10^5。与单体 ($10^{-3}molL^{-1}$)平衡的二聚体 ($molL^{-1}$) 的浓度是多少?

答：

调整方程式 (5.1)，$[A_2]=K[A]^2$。

因此，在平衡时，$[A_2]=10^5\ (10^{-3})^2 molL^{-1}=0.1molL^{-1}$

5.3　二聚合反应 $2A \rightleftharpoons A_2$，A 是克分子质量为 40 000 $gmol^{-1}$ 的蛋白质，平衡常数为 10^6molL^{-1}。当蛋白质的总浓度为 $1gL^{-1}$时的二聚体的重量百分数是多少?

答：

将所有的单位转换为一致是重要的。在此最方便的是使用 $molL^{-1}$。因此，克分子浓度是 $[A]=c_A/M$ 和 $[A_2]=c_{A_2}/2M_r$，这里的 c_A 和 c_{A_2} 分别是 A 和 A_2 的浓度 (gL^{-1})，M_r 是 A 的相对分子质量。

A 的总浓度是：$c_T=c_A+c_{A_2}$，因此，$c_{A_2}=c_T-c_A$

代进方程式 (5.1)，得到：

$$K=\frac{[A_2]}{[A]^2}=\frac{(c_T-c_A)/2M_r}{(c_A/M_r)^2}$$

调整并解 c_A 的二次方程式，得到两个根，一个是负的 (无意义)，一个是正的。正的根可由下列方程式得到：

$$c_A=\frac{-1+(1+8Kc_T/M_r)^{1/2}}{4K/M_r}$$

代入 K，c_T 和 M_r，得到：$c_A=0.13gL^{-1}$

所以，单体的重量百分数是 13，二聚体的重量百分数是 87。

5.4　以 $10gL^{-1}$的总浓度重复以上的计算。

答：

使用题 5.3 中同样的步骤，代入 c_A 的表达式，得到：

$$c_A=\frac{-1+[1+(8\times10^6\times10)/(4\times10^4)]^{1/2}}{4\times10^6/4\times10^4}gL^{-1}$$

$$=\frac{-1+(2001)^{1/2}}{100}gL^{-1}=0.437gL^{-1}$$

这表示在这个新浓度，只有总量的 4.4%，因此，二聚体的重量百分数是 95.6%。

注意这里反映的基本规律：如果进行自我聚合的分子总浓度增加，聚合形式的比例也增加。一个必然的结构是：稀释对单体有利。这是 Ostwald 稀释定律的一个例子。

血红蛋白

5.5　胎儿血红蛋白 (HbF) 是两条 α 链和两条 γ 链的四聚体。γ 链与 HbA 的 β 链相似，但

它们之间的序列有许多不同。一个显著的不同是：在β链中H21残基是带正电荷的组氨酸，而γ链中却是中性的丝氨酸。（a）解释：为什么HbF比正常成人血红蛋白（HbA）具有更高的氧亲和力？（b）这种效应为什么在生理上是重要的？

答：

(a) 在H21氨基酸的替换影响β-β裂隙（BPG结合位点），在HbF中少两个正电荷。因此，BPG与HbF结合的强度减弱，而且，氧更紧密的结合并较难从HbF释放出来。

(b) 该效应使得HbF通过胎盘从成熟的HbA夺取氧以供胎儿需要。

5.6 脊椎动物红细胞中，四聚体与氧结合是协同作用；二聚体没有协同效应。血蛤含有两种血红蛋白分子：由两对不相同的链构成的四聚体，以及1/3的同二聚体，这些链均具有与珠蛋白折叠相似的三级结构。在这些血蛤血红蛋白的四级结构中，位于血红素基团近侧和远侧的E和F螺旋与亚单位相互作用形成二聚体链之间广泛的接触有关。与脊椎动物血红蛋白（E和F螺旋在分子的外侧）相比，这是“背靠前”的。有趣的是，二聚体和四聚体蛤血红蛋白协同地与氧结合。请说明：如何证明软体动物二聚体血红蛋白的协同作用。

答：

与氧结合，F螺旋（含有近端的组氨酸残基）移动0.5Å。脊椎动物中，这个移动（在分子的表面）没有直接的效应，只作用于四聚体结构（$\alpha_1\beta_1$二聚体的硬度较大）。在蛤中，这样的移动将直接影响二聚体的结构，并导致对氧的亲和力增加，形成协同作用。

5.7 有许多异常和突变体血红蛋白，某些可导致病理状态。镰状红细胞血红蛋白（HbS）就是其中之一，其分子中，正常人血红蛋白（HbA）β链第6位的谷氨酸残基被置换为缬氨酸。这个位置（称为β6）在血红蛋白分子的外侧。HbS纯合子的个体可罹患循环系统疾病和贫血。这是因为：红细胞在静脉循环中成为镰状，导致其在毛细血管中的破裂，并主要被脾脏除去。为什么这样小的变化（总数为574氨基酸中的两个氨基酸）会引起这样大的影响？

答：

在可溶性蛋白质外侧的氨基酸残基几乎都是极性的。HbA中强极性的谷氨酸在HbS中被没有极性的缬氨酸所置换导致分子外部产生一个疏水区域。这样的一个“黏性”的斑点易于与其他分子上的互补结合位点相互作用。HbS（不是氧合的HbS）具有这样的一个位点，这导致HbS聚合成长的纤维状链，使红细胞的形状扭曲形成镰状。在热带非洲HbS基因极为常见，因为杂合子个体（罕见镰状）可以抵抗最危险的疟疾类型。一旦被疟疾感染，由于施加高的氧化压力，红细胞变为镰状；然后，这些细胞通过脾脏从循环系统中被清除出去。

5.8 血红蛋白α_1，β_2滑动接触中的突变一般导致协同效应的损失。在$Hb_{KEMPSEY}$，β链中天冬氨酸残基G1被天冬酰胺置换。这从滑动接触去掉了氢键（图5-12），这种滑动接触稳定脱氧血红蛋白的紧密结构，但不涉及氧合血红蛋白的松弛结构。该氨基酸的置换对$Hb_{KEMPSEY}$的氧亲和力有什么影响？

答：

由α_1，β_2和α_2，β_1两个滑动接触中的相互作用的丧失所导致的紧密结构稳定性的下降，氧与$Hb_{KEMPSEY}$结合所需的能量减少。因此，$Hb_{KEMPSEY}$具有较高的氧亲和力（$p50=15$托）和较低的Hill系数（见第9章和题5.21）。携有这种血红蛋白的个体可通过生成更多的红细胞来进行补偿。

细胞外基质

5.9 在身体中胶原蛋白分子存在一个连续的更新，例如，在骨的重建过程中和伤口愈合过

程中。有许多年，人们相信三重螺旋可以抵抗所有的蛋白水解酶的攻击。在最近 20 年中，发现了许多哺乳动物胶原酶，该酶对这三条链中的每一条，均可在自 N 端约 3/4 距离的甘氨酸和大的疏水残基（如：亮氨酸、异亮氨酸或苯丙氨酸）之间进行裂解。这是一个不稳定的区域，脯氨酸和羟脯氨酸含量较低。这种三重螺旋的裂解如何使胶原蛋白进行降解？

答：

哺乳动物胶原酶对胶原蛋白的特异裂解形成两个片段（在体温下不稳定），并开始解旋为单个的链。这对其他蛋白水解酶的攻击是敏感的。

5.10　VI 型胶原蛋白单体是最短的胶原蛋白分子（150 nm），1/3 质量为三重螺旋结构域，其余的 2/3 是两个末端球形区域。通过分散和旋转遮挡的电镜观察到下列结构含量最为丰富：

说明：该结构的构造，并讨论如何进一步装配形成伸展的微丝。

答：

左边的结构显示：由两条反平行的胶原蛋白 VI 型分子以交叉方式装配形成的二聚体，三重螺旋片段重叠 75 nm。该二聚体对称排列，其自由的（未重叠的）三重螺旋末端剪刀样交叉形成四聚体，示于右侧。这个四聚体作为原聚体形式而起作用，它末端和末端聚合，使末端进一步交叉形成线性的微丝多聚体。

5.11　纤维胶原蛋白（I、II、III 可能还有 V）链的基因含有约 50 个短的外显子（表达的区域），被长的内含子（不表达的区域）所隔离；在遗传信息被翻译为蛋白质链之前，内含子被除去（见第 17 章）。三重螺旋结构域的外显子较为特殊，它们都含有数个倍数的 9 个碱基对，54 倍是最为常见的，然后是 108 倍。如果 3 个核苷酸编码一个氨基酸，该基因的组构有何意义？

答：

每个外显子的翻译形成一个长的寡肽，是三个氨基酸的多倍数；18 和 36 个氨基酸长度是最常见的，相当于三重螺旋的 6 个或 12 个旋转。每个外显子开始于编码甘氨酸的密码子，其后每 9 个核苷酸为另外的密码子。这提示：胶原蛋白基因是从小的原始的基因进化而来，并且该基因的组构是非常保守的。

5.12　胶原蛋白合成中的缺陷可导致严重的结缔组织异常。在 Ehlers-Danlos 综合征 VII 的患者，皮肤薄、光滑（较难治愈），过度灵活的关节和弱的韧带，这些症状可导致关节错位。已有报道，在该综合征中，外显子 46（从 C 端起记数）缺失编码 α2（I）的基因。这个序列包括：前胶原蛋白 *N* -肽酶的切割位点和靠近胶原蛋白 α2（I）链的正常 N 端的一个赖氨酸残基。介绍该外显子的缺失对 I 型胶原蛋白结构的影响。

答：

N -肽酶的切割位点缺失将阻止 α2（I）前胶原蛋白链的适当的加工过程，因此，成熟链将具有大的 N 端伸展约 50 个氨基酸，这将干扰三重螺旋胶原蛋白分子适当的装配为原纤维。赖氨酸的缺失将阻止 4 个主要的链内交联（α2（I）链与其临近的链交错连接）的中的一个交联的形成。总的影响是削弱依赖于 I 型胶原蛋白的组织的张力强度。

5.13　在硫酸软骨素的合成中连续添加单糖单位的过程中需要多少特异的糖基转移酶？注意严格的底物特异性。

答：

需要 6 个糖基转移酶（图 5－21），它们作用的顺序如下：（1）二甲苯基转移酶，

(2) 半乳糖基转移酶 I（木糖特异），(3) 半乳糖基转移酶 II（半乳糖特异），(4) 葡萄糖醛酸转移酶 I（Gal-Gal 特异），(5) *N*－乙酰葡萄糖胺转移酶，(6) 葡萄糖醛酸转移酶 II（*N*－乙酰葡萄糖胺特异）。最后，硫酸基转移酶催化硫酸基团的加入。

细胞骨架

5.14 如果血影蛋白杂二聚体头靠头聚合，观察并解释像十二聚体那样大的高聚体。

答：

每个血影蛋白链的头另一个杂二聚体互补链的头部相互作用。在四聚体中，存在成对的相互作用（图 5－31），在更高级的寡聚体中，可形成一个闭合的环，由于头部区域较为柔软。这示于图 5－39 中六聚体，但这种自我装配可无限地进行。

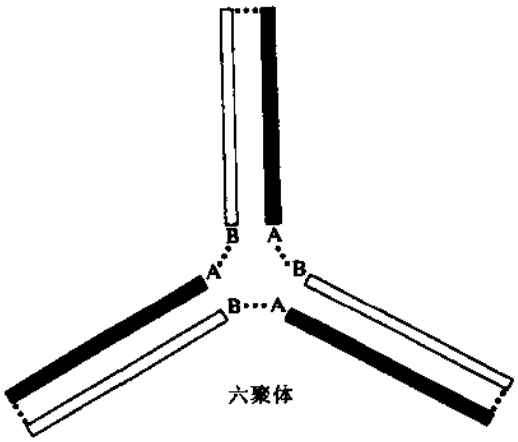


图 5－39

5.15 几种骨架蛋白含有长的盘曲螺旋结构域，其中，两个或三个 α－螺旋相互盘绕。在水溶液中 α－螺旋形成稳定的盘曲螺旋需要什么样的序列特点/

答：

α－螺旋每圈含有 3.6 个氨基酸残基，在盘曲螺旋中，这形成每两圈 α－螺旋 7 个残基。如果这 7 个残基表示为：a，b，c，d，e，f 和 g，残基 a 和 b（或 e，作为选择）将是疏水的。这些残基将相互靠近在 α－螺旋的一侧和盘曲螺旋的中心，由于疏水作用这个结构是稳定的。这称为七重复。

5.16 细胞中许多肌动蛋白和肌球蛋白的装配是临时的结构。一个例子是出现在细胞分裂过程中质膜下的收缩环。由于环的收缩，细胞的中央缩陷直至形成两个子代细胞。什么样的相互作用和过程导致这个收缩的发生？注意该环保持稳定的厚度。

答：

为了在肌动蛋白和肌球蛋白之间形成力量去作用于膜，收缩环必须通过特异的肌动蛋白集合蛋白质锚定在膜上。在细胞收缩时，该收缩环必须一点儿一点儿的去装配并保持稳定的厚度。

5.17 解释生物碱类药物秋水仙素（与微管二聚体紧密结合）如何阻止有丝分裂。

答：

秋水仙素与微管蛋白二聚体结合不仅阻止微管的形成和聚合，通过将游离的微管蛋白浓度降低到临界浓度以下，也可导致有丝分裂纺锤体的降解和解聚。类似的药物已被用于抗肿瘤。

5.18　核被膜是超分子装置，位于核的内表面。被膜的主要蛋白质是 A，B 和 C 核纤层蛋白，它们是中等纤维家族的成员。核纤层蛋白有何特征？

答：

中等纤维家族的蛋白质具有大的中心区域，该区域中的序列具有高度的可变性，它折叠成 α-螺旋并具有 7 重复单元使得盘曲螺旋结构域形成。在盘曲螺旋结构域之间的短随机部分是保守的。在两个球形末端区域存在着很大的序列差异。

补充问题

5.19　二聚合反应 $2A \rightleftharpoons A_2$，计算下列条件中二聚体的浓度（mol L^{-1}）：

	K	[A] (mol L^{-1})
(a)	10^3	10^{-3}
(b)	10^4	10^{-2}
(c)	10^6	10^{-4}

5.20　二聚合反应 $2A \rightleftharpoons A_2$，其中 A 是一个克分子质量为 50 000 g mol^{-1}的蛋白质；蛋白质总浓度是 1gL^{-1}，平衡常数是（a）10 000 和（b）10^8，计算：二聚体的重量百分数。

5.21　20 世纪初，Hill 推导出一个有用的方程式，精确地描述了血红蛋白的氧离曲线。方程式：

$$Y = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (p50)^n}$$

此处，Y 是血红蛋白氧结合位点被氧占据的分数，pO_2 是 O_2 的分压，$p50$ 是 Y = 0.5（即：50% 的位点被填满）时的氧分压，n 是 Hill 系数（度量协同程度）。人 HbA 的 n 值是 2.8，而肌红蛋白（没有协同作用）是 1。计算：血红蛋白从肺到作功的肌肉过程中饱和状态 ΔY 的变化，在下列条件下，肺的 pO_2 是 100 toor，肌肉的 pO_2 是 20 托：

	蛋白质	$p50$/torr	n
(a)	HbA	26	2.8
(b)	非协同作用的 Hb	26	1
(c)	Mb 样的 Hb	1	1
(d)	HbA 带有高 DPG	31	2.8
(e)	钳样二聚体 Hb	26	1.5

5.22　稳定脱氧血红蛋白的盐键之一与氯离子有关。说明：这个离子如何作为别构效应物而起作用。

5.23　在异常血红蛋白 Hb_{KANSAS}中，β 链 G4 是苏氨酸而不是 HbA 中的天冬酰胺。这个变化减弱氧合血红蛋白松弛状态滑动接触的相互作用，而不影响紧密状态。与 HbA 的氧亲和力比较，Hb_{KANSAS}的氧亲和力将如何变化？

5.24　下列哪个合成的多肽将形成与胶原蛋白相似的三重螺旋？

(a)（脯氨酸-甘氨酸）$_n$

(b)（脯氨酸-脯氨酸-甘氨酸）$_n$

(c)（脯氨酸-甘氨酸-甘氨酸）$_n$

(d)（脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-脯氨酸）$_n$

哪个形成的三重螺旋最稳定？

5.25　为什么胶原蛋白的三重螺旋对于提供张力强度是比 α 螺旋好的结构？

5.26　胶原蛋白前 α 链的部分序列为：-甘氨酸-脯氨酸-蛋氨酸-脯氨酸-丝氨酸-甘氨酸-脯氨酸-精氨酸-甘氨酸-亮氨酸-脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-脯氨酸-甘氨酸-丙氨酸-脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸-脯氨酸-精氨酸-甘氨酸-脯氨酸-脯氨酸-甘氨酸-谷氨酸-脯氨酸-甘氨酸-谷氨酸-脯氨酸-甘氨酸-丙氨酸-丝氨酸-。（a）有多少残基被脯氨酰基羟化酶羟化？（b）在胶原酶（源自气性坏疽有机体——溶组织杆菌）消化后可形成多少肽？该酶特异裂解序列-脯氨酸-X-甘氨酸-脯氨酸-中甘氨酸前的键。

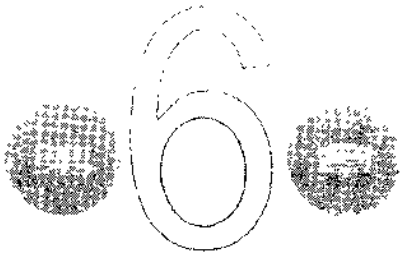
5.27　在骨形成的钙化过程中，沿胶原蛋白纤维间隔 67 nm 有羟基磷灰石的初步结晶。其原因是什么？

5.28　在骨关节炎中，形成蛋白聚糖片段。这些片段是通过（炎症反应中产生的）蛋白酶作用而形成的。在蛋白聚糖的什么位置蛋白酶最容易发生作用？

5.29　在 0.01% 的溶液中，透明质酸占据整个体积。1 分子透明质酸（$M_r = 1.5 \times 10^6$）占据的体积与 5 分子胶原蛋白（$M_r = 300\,000$；直径：1.5 nm；长度：300 nm）所占据的体积比例是多少？

5.30　中等纤维类型及其亚型的鉴别如何帮助癌症的诊断和分类？

5.31　在快速轴突运输中，动力蛋白驱动器可将囊泡从轴突的末端（微管的正端）运输到细胞体（微管的负端）。其行程可多达一米。由于动力蛋白是负端介导的驱动器，它如何以微管的正端作为起始位置？



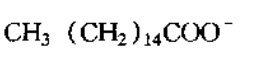
脂、膜、运输和信号

6.1 导言

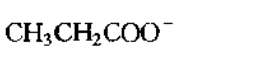
脂是一类从生物体内通过弱极性或非极性溶剂抽提而得到的不溶于水的化合物。这个定义是基于脂类的物理性质，而蛋白质、碳水化合物和核酸的定义却是基于它们的化学结构。所以，脂这个名词包括一群结构互不相同的化合物，而且脂的分类也没有一个普遍被认同的标准。

例 6.1

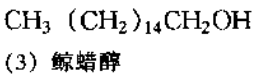
请指出下列化合物中的脂类化合物：



(1) 棕榈酸盐



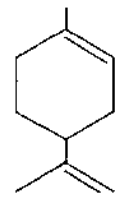
(2) 丙酸盐



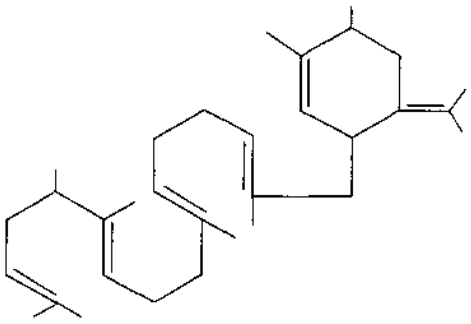
(3) 鲸蜡醇

(4) 苯

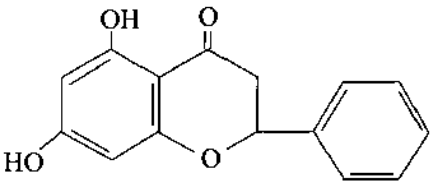
化合物 1、3 和 5 到 9 属于脂类，因为它们是生物体起源并且能够溶于有机溶剂。上述



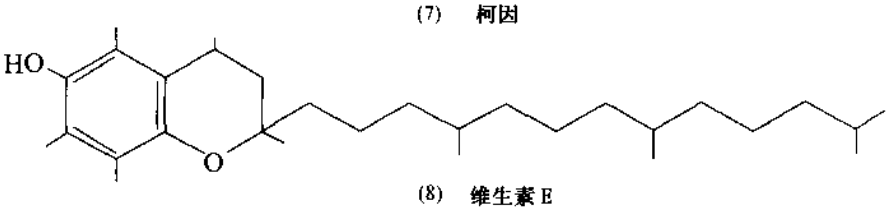
(5) 柠檬烯



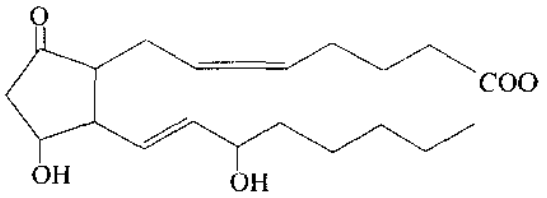
(6) 角鲨烯



(7) 柯因



(8) 维生素 E



(9) 前列腺素 E_2

化合物的氢和碳均占了很高的比例，因此而产生了定义中的第二个性质即它们不溶于水。化合物 4 不是脂，因为它不能独立存在于生物体内。化合物 2 是水溶性的，但因为它是属于化合物 1 系列中的一员，因此它通常被看作脂。

6.2 脂的分类

从生物学角度看，所有脂类的一个共同特征就是它们的碳氢组分均是由乙酸发生聚合反应而形成的，这个过程伴随着链的还原作用。(但是这种聚合反应也可以合成脂以外的其他化合物，所以这个性质不能作为脂类的定义。) 例如，乙酸的聚合反应能够引起下列物质的生成：

1. 长的线性烃链：

$$n\,CH_3COO^- \rightarrow\rightarrow CH_3COCH_2CO\cdots \rightarrow\rightarrow CH_3CH_2CH_2CH_2\cdots$$

这个反应的产物为脂肪酸 $CH_3(CH_2)_nCOOH$，而脂肪酸又可以导致胺和醇的生成。脂肪酸类的脂包括甘油酯、鞘脂和蜡。

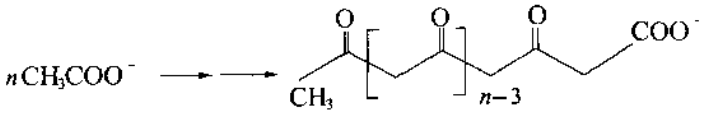
2. 通过一个五碳的中间物-异戊烯（异戊二烯）生成分支链烃：

$$3CH_3COO^- \longrightarrow \longrightarrow (CH_3—CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}—CH_2—) \longrightarrow \longrightarrow \text{萜}$$

（包括类固醇和类胡萝卜素）

3. 部分还原的线性或环状结构：

这些化合物称为聚酮化合物。大多数这类化合物为芳香性的，而且它们的形成路径遵循了苯环在自然界合成的原则。这类化合物不全都是脂，因为部分还原通常会留下含氧基团，这就导致生成的产物可溶于水。



例 6.2

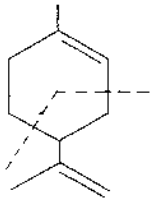
请说明例 6.1 中的各化合物的合成路径（以上三条路径）：

化合物 1、3 和 9 是通过路径 1 合成的。

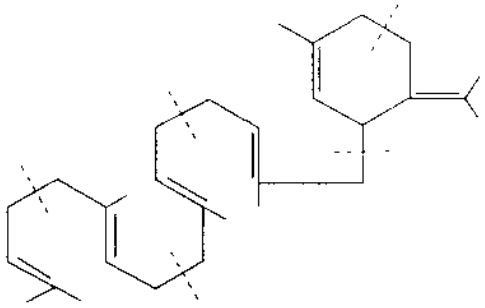
化合物 5 和 6 是通过路径 2 合成的。

化合物 7 通过路径 3 合成，而化合物 8 为路径 2 和 3 的混合产物。

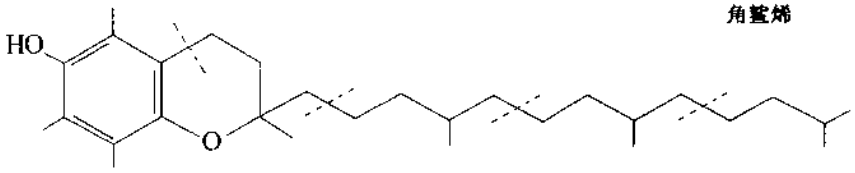
下列化合物是路径 2 的合成产物，它们的结构式的虚线断裂处即为异戊二烯单位的连接点：



柠檬烯



角鲨烯



维生素 E

6.3　脂肪酸

在自然界中，目前已发现 100 余种脂肪酸，它们主要在链的长度和饱和度方面有差异。几乎所有的脂肪酸都含有偶数碳原子，大部分由线性碳链组成，少数具有分支结构。自然界中只有极少数脂肪酸独立存在，绝大多数是作为其他脂类的酯化组分。羧基的 pK_a 大约为 5，在生理条件下，该基团以被称作酰基离子的离子状态存在，如软脂酸的离子软脂酸盐：$CH_3(CH_2)_{14}COO^-$。

例 6.3

下列为重要的生物学脂肪酸。

(a) 饱和脂肪酸：

$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$
软脂酸	硬脂酸
(十六烷酸)	(十六烷酸)
16:0	18:0

(b) 不饱和脂肪酸，双键通常为顺式构象：

$$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$$

棕榈烯酸

(顺-9-十六碳烯酸)

$16:1^{\Delta 9}$

(c) 多不饱和脂肪酸中，极少存在共轭双键：

$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH(CH_2)_7COOH$$

亚油酸

(顺-9，12-十八碳二烯酸)

$18:2^{\Delta 9,12}$

从例 3 中各脂肪酸的表示方法可见，脂肪酸的结构可通过数字符号表达。冒号左边的数字为脂肪酸的碳原子个数，右边是双键的个数，记号△后的数字表示了双键的碳原子位置，而碳原子的计数从脂肪酸的羧基端开始，羧基碳原子为第 1 个碳原子。

例 6.4

下列脂肪酸的数字名称、系统名称和常用名称分别为：

$$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$$

$18:1^{\Delta 9}$ 顺-9-十八碳烯酸（油酸）

$CH_3CH_2CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH(CH_2)_7COOH$

$18:3^{\Delta 9,12,15}$ 顺-9,12,15-十八碳三烯酸（α-亚麻酸）

$CH_3(CH_2)_4CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH{-}CH_2{-}CH{=}CH(CH_2)_3COOH$

$20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ 顺-5,8,11,14-二十碳四烯酸（花生四烯酸）

不同脂肪酸的熔点有显著差别，如：

软脂酸为63℃；硬脂酸为70℃；亚麻酸为13℃

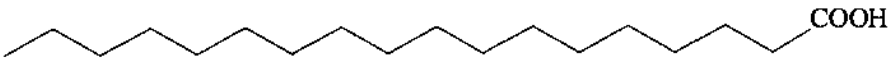
反油酸（反-9-十八碳烯酸）为44℃

亚油酸为-5℃；α-亚麻酸为-11℃

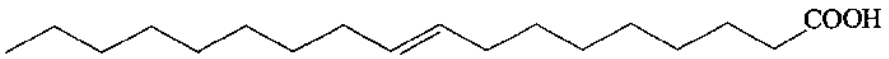
问题：为什么碳原子数目相同的脂肪酸熔点不同？

一个饱和链状碳原子的首选构象为长的直链结构。一个顺式双键会引起结构上的弯曲，与相同长度的饱和脂肪酸相比，这将会导致不易折叠为晶体结构。而反式双键不会引起链的弯曲。例如：

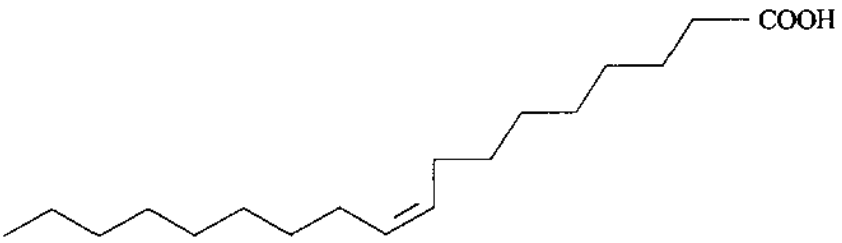
1. 饱和碳链



2. 有一个反式双键的碳链



3. 有一个顺式双键的碳链



与相同长度的弯曲分子相比，直链分子能够更紧密地聚集在一起，形成高熔点的晶体结构；换句话说，在加热时它们需要更多的能量才能相互分离。

生物体中的不饱和脂肪酸顺式双键多于反式双键，这就保证了含有脂肪酸的脂类具有较低的熔点，因而使它们在生理温度下保持液态。

问题：除不饱和外，还有哪些结构对脂肪酸的熔点有影响？

分支结构也对脂肪酸的熔点有影响。例如：硬脂酸（18个碳原子）和花生酸（20个碳原子）均是饱和线性的，它们的熔点分别为70℃和75℃，而10-甲基硬脂酸为10℃。然而，生物体内鲜有分支结构的脂肪酸，它们合成途径的进化也并非是保持脂类流动性的主要方式。

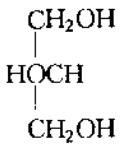
$$CH_3(CH_2)_7\underset{\displaystyle H_3}{\underset{|}{C}}H(CH_2)_8COOH$$

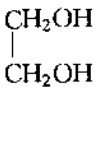
10-甲基硬脂酸

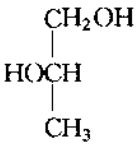
6.4 甘油脂

甘油脂为甘油的羟基基团被取代的一类脂。从数量上讲，甘油脂是动物体内含量最丰富

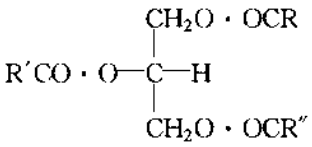
的脂类。二元醇类的脂与甘油脂结构类似，但含量不足甘油脂的1%。这类脂中常见的二元醇如乙二醇、1,2－丙二醇和1,3－丙二醇，因为它们很稀有，因此二元醇类的脂类就不作进一步讨论。


甘油


乙二醇


1，2－丙二醇

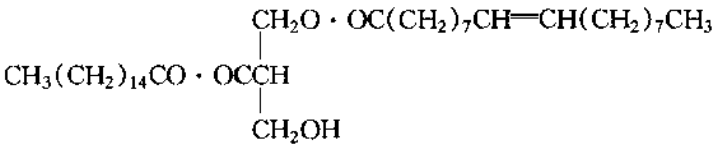
三酰甘油


1,2,3－三酰基－*sn*－甘油

三酰甘油（TAG）是中性的甘油脂，也称作甘油三酯。三酰甘油中甘油的三个羟基基团都分别被酯化，通常是被不同的脂肪酸酯化，这就使得甘油的第二个碳原子出现半手性。三酰甘油和其他甘油衍生物通常用一种传统的命名法命名，将衍生物以第二个羟基在左侧画出费歇尔投影式（第2章），从上到下的碳原子分别为第1、2和3位，前缀 *sn*－（立体专一性计数）位于甘油之前。例如（见左图）：

例6.5

1－油酰－2－棕榈酰－*sn*－甘油的结构式为：



这是一个二酰甘油，细胞内发现二酰和单酰甘油的存在，但含量较低，它们主要是三酰甘油和磷脂的代谢产物。

三酰甘油因为具有食物贮藏的功能，所以是动物体内含量最多的脂。三酰甘油主要存在于脂肪组织的细胞内，在那里它们形成贮存脂肪。三酰甘油的酯键水解后从脂肪组织释放甘油和脂肪酸的过程称为脂肪动员，贮存脂肪是不溶于水的三酰甘油的混合物，这些混合物中的三酰甘油因组成的三个脂酰基的不同而性质各异。

问题：贮存脂肪内的不饱和脂肪酸含量很高，这个性质对细胞有何益处？

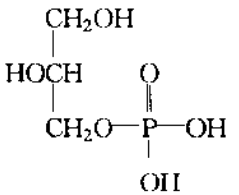
高含量的不饱和脂肪酸有助于脂在细胞内保持液态。固体脂肪仅少量存在于细胞表面，以便酶存在于能使它保持流动性的细胞质中。同样，固体脂肪会使脂肪组织坚硬，在机械压力下不易弯曲。

通常贮存脂肪的熔点比体温低几度，贮存脂肪脂肪酸的组成要兼顾保持脂肪流动性和储存足够能量两方面（氧化时，不饱和脂肪酸比相同长度的饱和脂肪酸产能少。）。

磷酸甘油酯

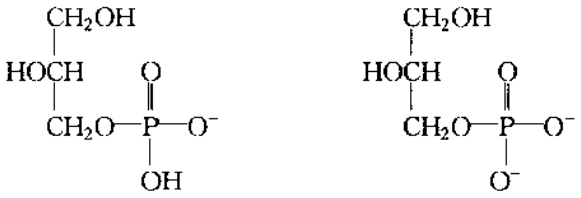
磷酸甘油酯为极性的甘油脂，通常指磷脂。磷脂也指其他不含甘油但含磷的脂类，即只要含磷的脂类通称为磷脂。

所有的磷酸甘油酯均来源于 *sn*－甘油－3－磷酸，其中的磷酸与C－3的羟基发生酯化，C－1和C－2的羟基分别与脂肪酸发生酯化。


sn－甘油－3－磷酸

问题：*sn*-甘油-3-磷酸在生理pH时将以怎样的形式存在？

磷酸单酯的pK_a值分别约为1和6，因此，当pH为7时，存在两种离子形式，其中二价阴离子占主导地位：



磷酸甘油酯是以与磷酸甘油发生酯化反应的醇的性质进行命名和分类的（表6.1）。

绝大多数磷酸甘油酯的C-1上的脂肪酸为饱和的，而C-2上的为不饱和的。尽管磷酸甘油酯的结构各异，但它们是被不同脂肪酸酯化的具有相同的X基团的混合物。有些磷酸甘油酯的C-1被长链的脂肪醇醚化（而非酯化），例如缩醛磷脂（如右图）。

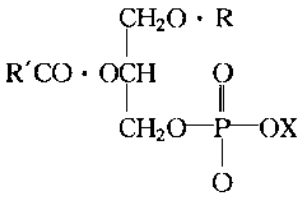
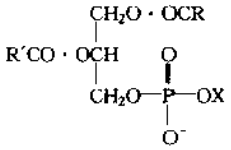
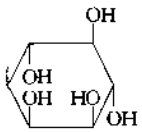


表6.1 一些主要的磷酸甘油酯



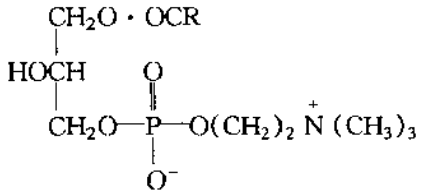
X—OH的名称	X的结构	磷酸甘油酯的名称（符号）
水	—H	磷脂酸［磷脂酸离子］（PA）
乙醇胺	—CH_2—CH_2NH_3	磷脂酰乙醇胺（PE）
胆碱	—CH_2—$CH_2N(CH_3)_3$	磷脂酰胆碱（PC）
丝氨酸	—CH_2CHNH_3 COO	磷脂酰丝氨酸（PS）
甘油	—$CH_2CH(OH)CH_2OH$	磷脂酰甘油（PG）
磷脂酰甘油	—$CH_2CH(OH)CH_2OPOCH_2$ O HCO·OCR R′CO·OCH_2	二磷脂酰甘油［心磷脂］（DPG）
肌醇		磷脂酰肌醇（PI）

问题：为什么磷酸甘油酯常被称作极性脂类？

磷酸甘油酯之所以被称作极性脂类是因为磷酸甘油酯的酯化的磷酸带有电荷。但极性是一个相对意义上的概念，相对于三酰甘油，磷酸甘油酯为极性的；但从绝对意义上讲，磷酸甘油酯为非极性的，因为它们不溶于水。

动物细胞内的磷酸甘油酯大约有1%是以溶血磷酸甘油酯的形式存在。溶血磷酸甘油酯由于磷酸甘油酯C-2上的酰基丢失而形成，它们的命名是在相应的磷酸甘油酯前加前缀溶血。

问题：请写出溶血磷脂酰胆碱的结构式。

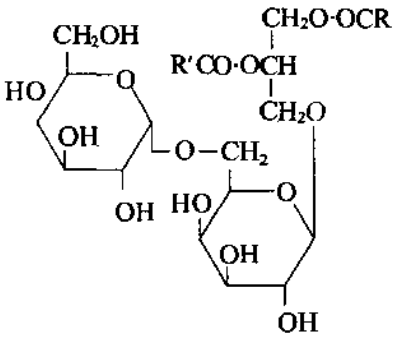


糖甘油脂

在某些方面，糖甘油脂与磷酸甘油酯相似，它们同样都含有疏水和极性（亲水）部分。糖甘油脂的极性部分并非磷酸而是糖。

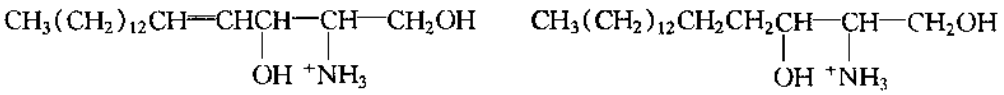
例6.6

一个典型的糖甘油脂为6-α-D-吡喃半乳糖-β-D-吡喃半乳糖甘油二酯。书写糖的方法已在第2章介绍过，因而这个糖甘油脂的结构为：



6.5 鞘脂

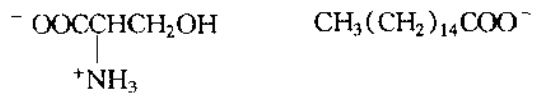
鞘脂是由长链的羟化碱衍生而来，并非甘油的衍生物。动物体内发现两种鞘脂：鞘氨醇和二氢鞘氨醇（神经鞘氨醇），鞘氨醇更为常见。



鞘氨醇　　神经鞘氨醇

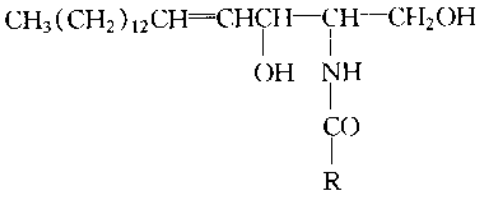
问题：在生物体中，神经鞘氨醇是由哪种化合物合成的？

神经鞘氨醇的极性部分与丝氨酸相似，非极性部分与软脂酸相似，二者发生还原反应，释放1分子CO_2即产生神经鞘氨醇。



(a)　　(b)

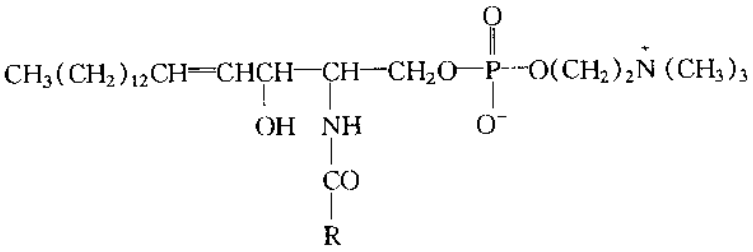
当鞘氨醇或神经鞘氨醇的氨基与脂肪酸发生酰基化反应后可生成神经酰胺。



磷酸鞘脂和鞘糖脂是神经酰胺的第一个羟基分别以两种方式取代而形成。

磷酸鞘脂

在磷酸鞘脂中，鞘脂的第一个羟基与磷酰胆碱发生酯化反应，形成的脂即为鞘磷脂。它具有如下结构：



鞘磷脂

鞘磷脂中的酯酰基一般不常见，例如：

木蜡酰基 24:0

神经酰基 $24:1^{\Delta 15}$

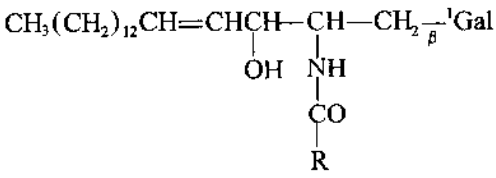
脑酮酰基 24:0，C-2 羟基化

鞘 糖 脂

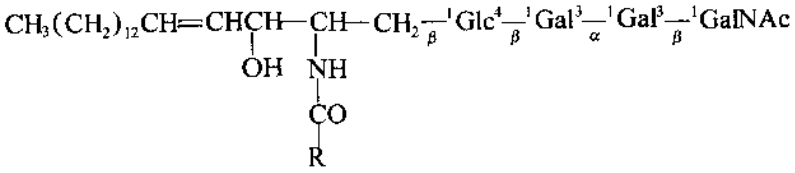
鞘糖脂中的第一个羟基被糖化，即羟基被大分子的糖取代，而不是被单糖或寡糖取代。鞘糖脂中糖的部分如果含有唾液酸残基，则被称作神经节苷脂。根据所含糖的不同，目前已发现至少 50 种鞘糖脂，并且，每一种鞘糖脂的神经酰胺部分也含不同的脂肪酸。

例 6.7

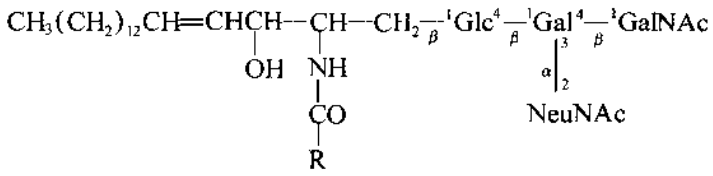
以下为一些常见的鞘糖脂：



半乳糖苷神经酰胺



红细胞糖苷脂



Tag-Sachs神经节苷脂

Glc：葡萄糖；Gal：半乳糖；GalNAc：*N* －乙酰氨基半乳糖；NeuNAc：唾液酸

6.6　源自异戊二烯（萜）的脂类

萜最初是指用水蒸气蒸馏松节油（一种松树的抽提物）而得到的油。它具有以下特点：

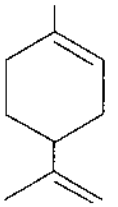
1. 油脂中存在的萜类绝大多数含有 $C_{10}H_{15}$的结构。

2. 萜类所含的碳原子数目均大于 10，通常为 5 的倍数，而它们的结构各异。

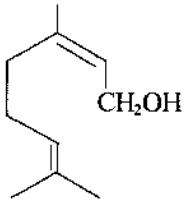
3. 许多相似的水不溶性的萜类在自然界中分布非常广泛。许多植物中发现大量的萜，它们同样也存在于其他生物中。

萜类

单萜为含有 10 个碳原子的萜类，例如：

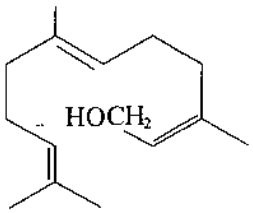


柠檬烯

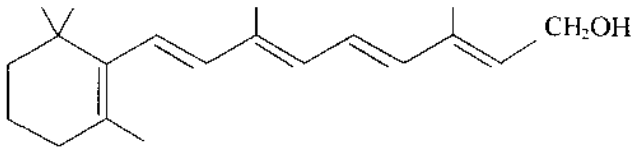


牻牛儿醇（香叶醇）

倍半萜和二萜分别含有 15 和 20 个碳原子，例如：

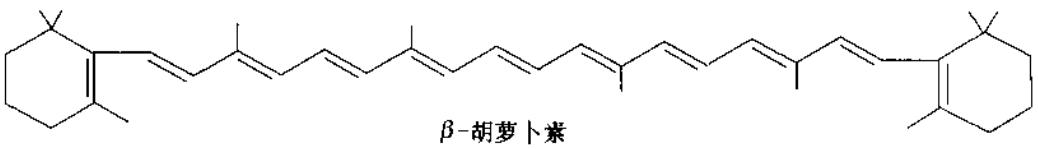


法尼醇



维生素 E

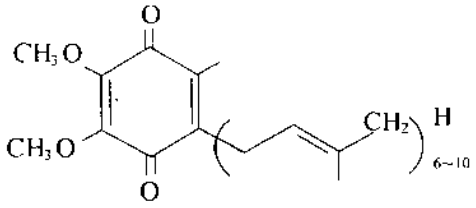
三萜（含 30 个碳原子）和四萜（含 40 个碳原子）需特别注意，因为它们能够产生类固醇和类胡萝卜素。角鲨烯（一种三萜）是例 6.1 中的化合物 6。



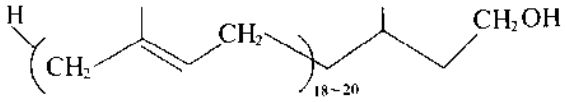
β-胡萝卜素

自然界内也存在多聚萜类，如橡胶等。但从生化角度看，泛醌和多萜醇特别重要（参见

第14章)。



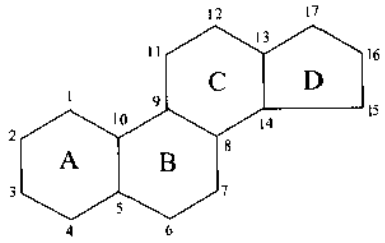
泛醌



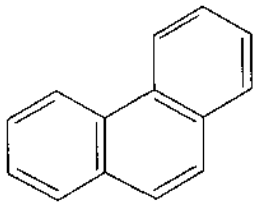
多萜醇

类固醇

从结构看，类固醇是还原性的芳香族碳氢化合物环戊烷多氢菲的衍生物。尽管在结构上与菲相关，但类固醇并非聚酮化合物而为真正的萜类，在生物体内，它们是由异戊二烯通过角鲨烯而合成的。

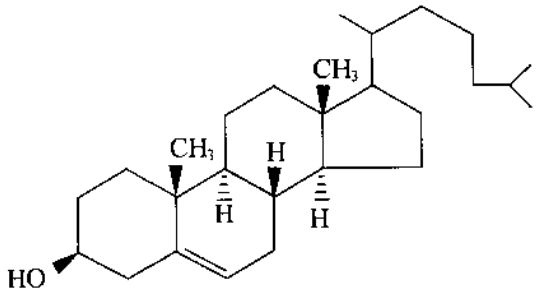


环戊烷多氢菲

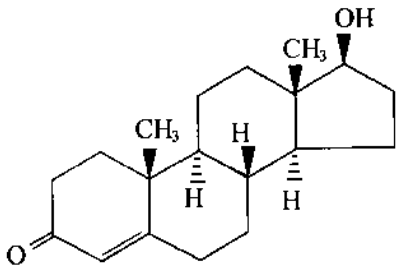


菲

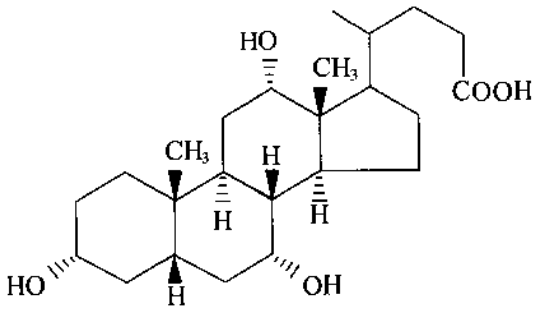
固醇类化合物是含有一个或多个羟基的类固醇。例如：胆固醇——动物细胞膜的主要组分；睾酮——一种性激素；胆酸——胆汁的一种主要组分。



胆固醇



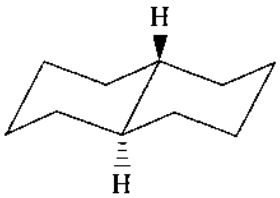
睾酮



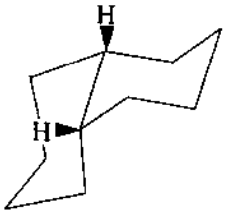
胆酸

稠环体系是一种非常重要的平面结构，下图中的►和||||，分别代表固醇分子上的取代基是位于平面前（β）还是平面后（α）。两个稠环之间共同拥有的碳原子的取代基的构型决

定了固醇分子构象的顺反式，反式稠环为平直结构，而顺式稠环为弯曲结构。胆固醇和睾酮为顺式稠环，它们是很重要的平面结构。

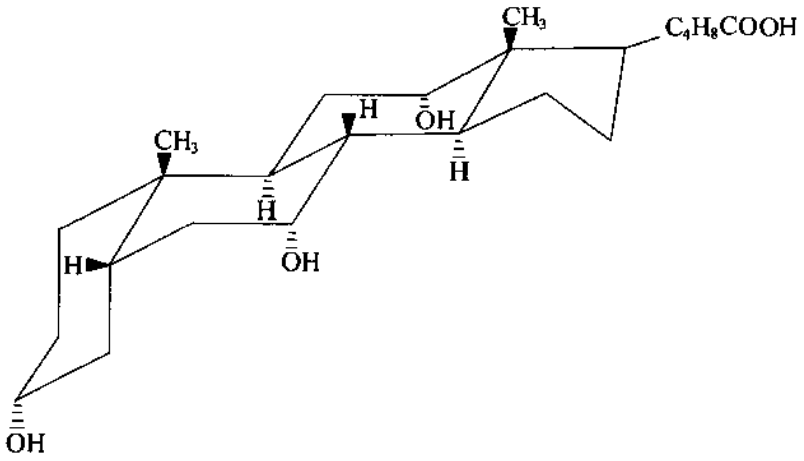


反式稠环



顺式稠环

问题：请问胆酸的三维结构中稠环是怎样排列的？



类胡萝卜素

类胡萝卜素是含 40 个碳原子的烃即胡萝卜素的羟基衍生物。这类化合物高度共轭，所以能吸收可见光，根据吸收色素为黄和红，可分为胡萝卜素和类胡萝卜素。这些色素常常参与生物体与光的相互作用，因此，b-胡萝卜素（一种四萜）在动物体内能代谢为维生素 A（二者的结构见前），而维生素 A 对视觉活动很必要。

6.7　脂在水中的性质

从定义看，脂不溶于水。但脂存在于水环境中，并且脂具有亲水性，因此，脂在水中的性质具有非常重要的生化意义。

许多脂类具有两亲性，即它们由两部分组成——非极性的烃区域和极性区域（或离子区域，或既有极性又含离子的区域）。

问题：以下脂类哪些具有两亲性：脂肪酸；酰基离子；三酰甘油；胆固醇；磷酸甘油酯；鞘磷脂；鞘糖脂？

脂肪酸、三酰甘油和胆固醇为非两亲性的，因为它们所含的极性非常弱。而其他化合物的分子含有至少 1 个以上的电荷或大量羟基，因而具有两亲性。

当两亲性分子分散于水时，疏水部分（即烃链）通过自聚集作用从溶剂中分离出。聚集产物即为微团（指分散于水中的聚集物）和单分子层（指水－空气边界的聚集物）。图 6－1 表明一个亲水脂分子（以符号 O—表示，O 代表极性头部，—代表非极性尾部）是怎样在水的表面形成单分子层，极性头部与水相连，以保证非极性尾部尽可能远离水。

烃链疏远极性溶剂——水的倾向即为疏水效应（第 4 章）。烃不与水形成氢键，而水包围着烃有助于水分子之间形成氢键。与没有烃时相比，有烃时，水的结构更规则。换句话说，烃不存在时，水失去熵（第 10 章），因而处于热力学不稳定状态。这种状态由于烃有序地存在而避免，以便烃远离水，因此使靠近烃的水分子不太规则。所以，疏水效应被称作熵驱动。

仅有一小部分两亲性脂分散在水中时能够形成单分子层（除非水以非常薄的薄膜存在），这时大量的脂形成了可溶性的微团。微团有各种各样的形式以满足疏水效应。图 6－2 是一个球形微团的示意图，当然也存在椭圆形、圆盘状和圆柱状的微团。

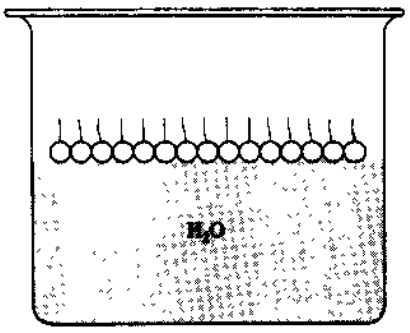


图 6－1

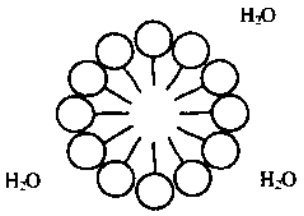
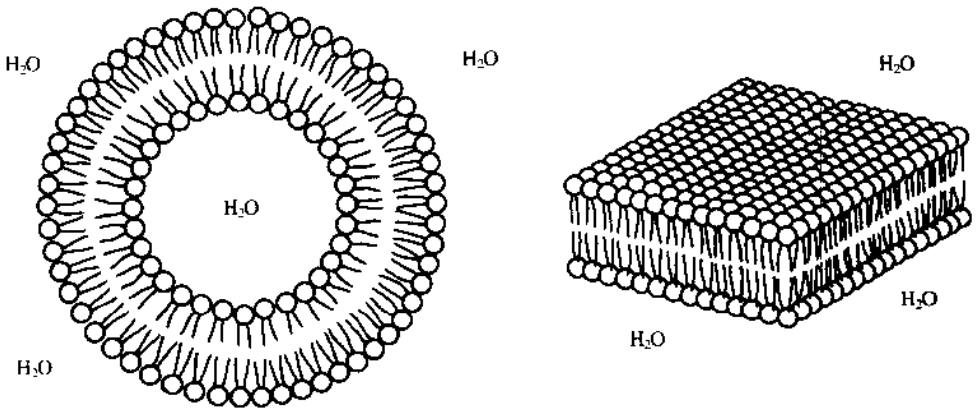


图 6－2

闭合的空心球状的双分子层结构也有可能存在［图 6－3（a)］，这种结构称作小泡。

问题：请问是否还存在适应于水的其他两亲性脂类？

闭合的空心球状的双分子层结构也有可能存在［图 6－3（a)］，这种结构称作小泡。小泡最主要的概念就是两层脂分子的烃链相对［双分子层，图 6－3（b)］，分离的双分子层不可能像分离前那样存在于水中，因为非极性尾部将会在边缘暴露，这种情况能够通过脂的片层的弯曲形成一个自我封闭的空心球状得以避免。



(a) 空心球状　　(b) 片状

图 6－3　脂双分子层的形式

微团和双分子层都是通过两种相反的力的作用产生：①使烃链聚集的疏水力效应能产生烃链之间的吸引力作用（范德华引力）和②极性头部的排斥作用。

问题：微团大小的最小限度由什么决定？

由疏水效应决定。在水－烃界面消除之前，必须有最小数目的烃链相结合，这种结合过程是协同过程，因此就决定了微团的最小限度。

问题：微团大小的最大限度由什么决定？

由极性头部的排斥作用决定。与极性头部和一个烃链相连的两亲性脂分子相比，每个极性头部与两个烃链相连的两亲性脂分子，其非极性基团的体积是前者的两倍。后一种情况会产生更大的排斥力以阻止脂分子紧密结合，因而保持了微团的最小尺寸。而前一种情况排斥力较小，烃链体积相对较大，这样就能形成较大的结构，即双分子层和小泡。

问题：分别是哪种脂类形成小微团、小泡和双分子层？

一个两亲性分子的烃链相对于极性头部的长度，对其在极性溶剂如水中形成微团或小泡具有影响。酰基离子和溶血磷酸甘油酯形成小微团；磷酸甘油酯、磷酸鞘脂、缩醛磷脂、甘油糖脂和鞘糖脂形成小泡和双分子。

问题：以下因素①烃链的长度，②水介质的离子强度，③两亲性分子的浓度分别如何影响小微团的大小？

1. 越长的烃链形成的微团越大，因为这样烃相对于头部的体积比率越高，非极性尾部间的吸引力（范德华引力）就会超过极性头部间的离子排斥力。
2. 增强水介质的离子强度，将形成较大的微团。因为高离子强度将降低极性头部的排斥力，这样将使更多的脂分子聚集在一起。
3. 如果两亲性分子浓度很低，将不会形成微团。从非聚集状态到微团的转变在一个很窄的浓度范围进行，即临界胶团浓度。

问题：胆固醇在形成微团过程中的作用是什么？

胆固醇不形成微团，因为①它不是两亲性分子，②其平面的、坚硬的稠环结构使之成为固态而非液态，而流动的烃对微团的形成很必要。胆固醇可与两亲性脂类形成混合微团并进入单分子层内。

6.8　胆汁酸和胆盐

胆汁酸是胆固醇在肝脏内的代谢产物，是含有 24 个碳原子的二羟基和三羟基类固醇。胆汁酸的结构见 6.6，脱氧胆酸和鹅胆酸是另外两种胆汁酸。胆汁酸中所有羟基都是 a 型，两个甲基则为 b 型，因此，胆汁酸分子的一侧比另一侧极性强。胆汁酸分子并非平直而是弯曲的，因为其 A 和 B 环为顺式构象。

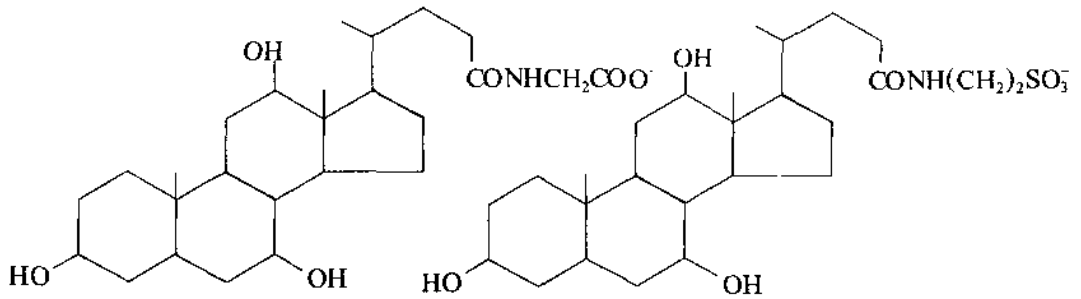
肝脏产生的胆汁酸以胆盐的形式聚集在胆囊中，胆盐是胆汁酸的羧基与甘氨酸或牛磺酸结合后的产物。

$^{+}NH_3CH_2COO^{-}$　　$^{+}NH_3CH_2CH_2SO_3^{-}$

甘氨酸　　牛磺酸

例 6.8

甘氨胆酸盐和牛磺胆酸盐的结构为：



甘氨胆酸盐　　牛磺胆酸盐

胆盐具有去污剂的性质，但不形成典型的微团。

问题：胆盐为何不会形成典型的微团？

尽管胆盐有极性头部和非极性尾部，但其非极性尾部不全是烃，分子一侧还有两个或三个羟基。此外，同胆固醇一样（胆固醇也不形成典型的微团），

刚性环系能使胆盐分子更紧密的聚集，几乎成为固态非极性相而非液态非极性相。胆盐能够与磷脂混合形成微团。

目前还不清楚聚集的胆盐的确切结构，但能确定的是，相邻胆盐分子之间由于羟基间的氢键而连接。胆盐是非常有效的乳化剂，它们能够在肠内乳化饮食中的脂，使得脂更易受消化酶的作用。此外，肠黏膜细胞吸收消化后的脂同样需要胆盐。

6.9 血浆脂蛋白

血浆中含有一系列可溶性的脂蛋白，根据各自的密度不同，可以分为四种主要类型，这些脂蛋白复合体的作用是作为脂的运输系统。血液中单独的脂是不可溶的，但当这些脂与特殊的蛋白质结合后，就变得可溶并可运输，所以这些蛋白质被称作脂蛋白。人体血液中有四种基本类型的脂蛋白：①乳糜微粒，②极低密度脂蛋白（VLDL），③低密度脂蛋白（LDL），④高密度脂蛋白（HDL）。它们的性质请见表6.2。

表6.2 血浆脂蛋白

	乳糜微粒	VLDL	LDL	HDL
密度/（$g\ ml^{-1}$）	<0.95	0.95~1.006	1.006~1.063	1.063~1.21
最大直径/nm	500	70	25	15
组成含量/%*				
蛋白质	2	10	22	33
三酰甘油	83	50	19	8
磷脂	7	18	22	29
胆固醇和胆固醇酯	8	22	46	30

* 以脂蛋白干重计。

血浆脂蛋白的不同组成与其不同功能相关。从本质上讲，三酰甘油内富含的脂蛋白是由肝脏（VLDL）和小肠（乳糜微粒）合成的，它们将中性脂肪运输到肝外组织中（特别是脂

肪组织中)。没有结合脂肪的脂蛋白密度较高，它们在胆固醇的运输中起重要作用。

问题：请问一个脂蛋白微粒的一般结构是什么?

请见图 6-4。球形微粒的极性表面使得脂蛋白溶于水，但这种结构仅为一个假设。乳糜微粒和 VLDL 的极性部分很少，而且当脂蛋白与靶组织的细胞膜结合时，蛋白质仍保持可溶性并不与细胞膜结合。这种现象表明脂蛋白内的蛋白质具有非同一般的性质，其中一些蛋白质的氨基酸序列是固有的并且有疏水区域，也即这些蛋白质具有与烃亲和的结构（如三酰甘油和磷脂的尾部)。

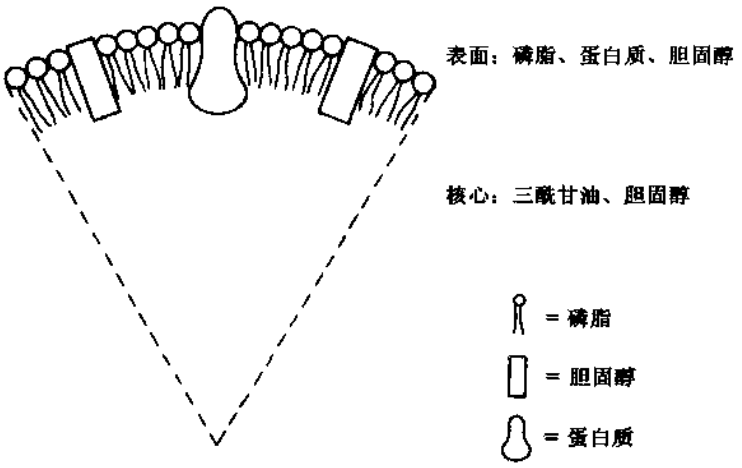


图 6-4

6.10　小泡

当将水加入某种含有长链的干磷脂内时，磷脂便会膨胀，当磷脂分散到更多的水中时，就形成脂质体的结构。脂质体是具有多层磷脂的小泡，请见图 6-5。当超声振动（超声处

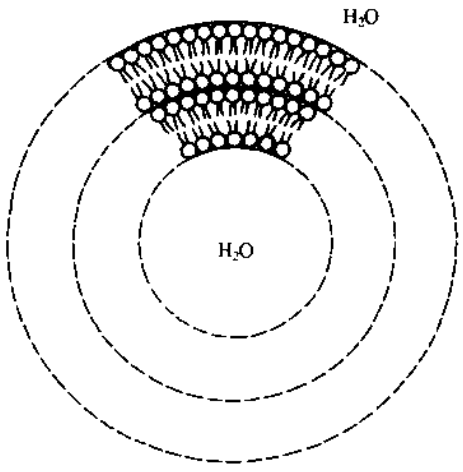


图 6-5

理）时，脂质体就会转变为只有双层磷脂的小泡。

问题：小泡也可以通过在去污剂中透析磷脂溶液而形成，这种情况下小泡是怎样形成的？

磷脂和去污剂形成混合微团，但其中带有长链烃的去污剂占优势，因此形成的微团较小。透析降低了水溶性去污剂的浓度，导致微团中磷脂占据优势，又因每分子磷脂含有两个烃链，所以微团体积膨大，这样微团就彼此融合形成了双分子层。

问题：磷脂混合物形成的小泡，其双分子层的磷脂并非在两层均匀分布，其原因是什么？

小泡的高度弯曲使外表面是内表面的三倍，因此，外层脂分子的数量比内层多两倍。外层较密，因为双分子层中心的收缩增强，迫使烃链充分地扩张。头部较大的磷脂（如 PC），更易进入外层，因小泡的外层压缩空间较少，因而排斥力较弱。请见图 6-6。

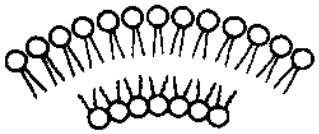


图 6-6

通过前一个问题方式形成的小泡事实上不能渗透到小的阳离子和大多数大的极性分子中，但对于 Cl^- 有轻微的渗透性。水的渗透性很高，因为液态烃水的溶解性起了作用。小泡形成过程中有蛋白质存在时，蛋白质便会进入磷脂双分子层内。这样的小泡称作脂蛋白体。

除用磷脂和蛋白质人工制造小泡外，通常也可以采用超声处理细胞的细胞膜形成小泡。人造小泡和从细胞膜形成的小泡在研究膜的运输现象时非常有用。小泡也可以自然地形成，如真核细胞的高尔基体出芽时即可形成小泡。

6.11 膜

细胞的细胞质被一层质膜包围，核、溶酶体和线粒体等亚细胞结构也被膜包围而形成特定的细胞器。真核生物的内质网是与细胞膜相连的非常丰富的内膜系统，线粒体也具有高度折叠的内膜系统。

问题：请问这些膜具有什么功能？

膜将细胞与环境分离，还将细胞的不同部分分离，使细胞及其各部分具有相对独立的活动。膜是一个物理屏障，有适当的选择通透性，控制有益和有害物质的进出，并且影响所选择化合物的流量。膜还能提供一个非水条件的环境以便某些化学反应的进行。

膜包括脂、蛋白质和少量的糖。膜的类型不同，所含各组分的比例有较大的变化。糖一般以糖甘油脂、鞘糖脂和糖蛋白的形式存在。膜中所含最普遍的脂为磷酸甘油酯和磷酸鞘脂（鞘磷脂）。胆固醇存在于动物质膜中，植物质膜内很少见。

鞘糖脂存在于神经和肌肉组织的膜中。尽管极性头部的类型和数量各异，但所有膜的脂类都含有相似的烃链。

一些膜的组成请见表 6.3。

表 6.3　膜的组成

膜	组分（占膜重量的百分比）			脂的组成*（占总脂的百分比）+									
	蛋白质	脂	糖	PA	PC	PE	PI	PS	PG	DPG	SM	GS	Chol
人体红细胞	49	43	8	2	19	18	1	8	-		18	10	25
人体髓磷脂	18	79	3	1	10	20	1	9	-	-	8	26	26
大鼠肝脏													
细胞质	55	40	5	1	19	12	4	9	-	-	14	-	30
外部线粒体	50	47	3	1	48	22	12	2	2	3	5	-	5
内部线粒体	75	25	-	1	43	24	6	1	2	18	2		3
大肠杆菌细胞质				tr‡	-	65		tr	18	12	-	-	-

* SM：鞘磷脂；GS：鞘糖脂；Chol：胆固醇

\+ 一些脂的各组分总量不到 100%，因为此表没有列出所有的脂。

‡tr：痕量。

问题：考虑到①膜内脂的性质和②膜的两维结构，脂分子在膜中是如何排列的？

脂在人造小泡中是一个闭合的双层结构（图 6－3）。自然发生的膜被称作生物膜，以区别于人造小泡及用细胞膜制成的小泡。

膜上的一些蛋白质可通过断裂离子键和极性键的试剂（如尿素或高浓度的盐溶液）除去，这些蛋白为外部或外周蛋白。其他蛋白质为内部或整合蛋白，它们只能通过去污剂或有机溶剂处理膜而除去。

问题：就膜中蛋白质的定位而言，有关外周蛋白和内部蛋白的观察结果说明了什么问题？

如果膜主要由极性脂类组成双分子层，则外周蛋白位于双分子层的表面，通过离子键和极性键与脂的极性头部或整合蛋白相连。整合蛋白通过范德华力和疏水作用深深地镶嵌在双分子层内部。

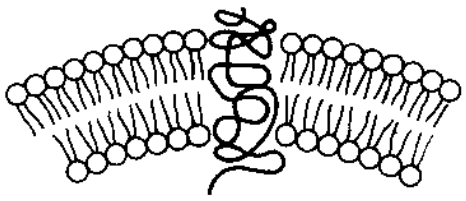


图 6－7

问题：从膜上分离的一些整合蛋白分子质量较高，请解释这些蛋白质如何与脂质双分子层相适应？

这类蛋白质横跨全膜（图 6－7）。凸出于膜两侧的均为极性部分，镶嵌在双分子层内部的蛋白质是由含疏水侧链的氨基酸组成，或者是蛋白质的肽链折叠，将亲水侧链凸出于双分子层以远离脂。跨膜的整合蛋白的长度可达膜厚度的 12 倍甚至更多。

尽管只有少量的整合蛋白被纯化，但许多整合蛋白的氨基酸序列现已确知。这些整合蛋白的跨膜区域是由 20 个氨基酸组成，在这 20 个氨基酸中疏水性氨基酸含量很高。

迄今为止，即使是从同种生物中也还没有发现所有膜含有一种共同的蛋白质组分（比较了几乎所有的 PC 和 PE）。所以，膜中的蛋白质也没有一个普遍的结构。膜的类型不同，膜所含蛋白质的数目也不同。嗜盐细菌的质膜仅含一种蛋白质（细菌视紫红质），而其他细菌如大肠杆菌含有大约 100 种。人体红细胞的质膜至少含有 17 种不同的蛋白质。

在关于膜中脂和蛋白质关系的争论中，S. J. Singer 和 G. L. Nicolson 于 1972 年提出了膜结构的流动镶嵌模型（图 6－8），此模型现为脂结构的一个公认模式。

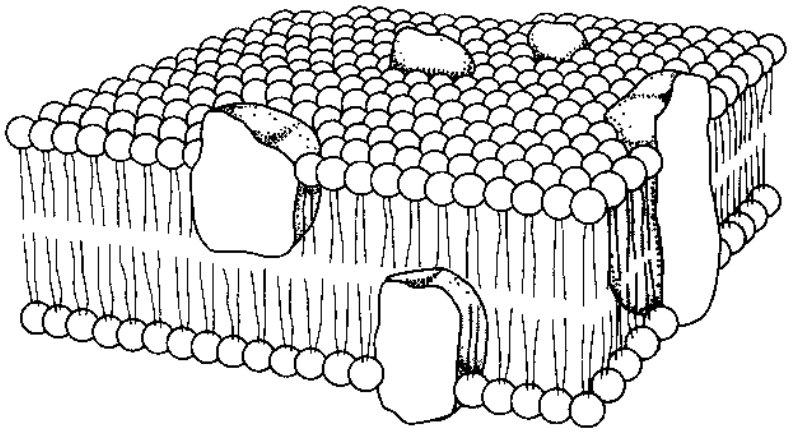


图 6-8 膜结构的流动镶嵌模型

极性脂双分子层厚约 5 nm，不规则形状的块状物表示蛋白质，其中包括跨膜蛋白。

问题：将图 6-8 的模型描述为一个液态的、流动的结构，其含义是什么？

这个模型不是固态的，因为烃链是液态的，而脂和蛋白质均可进行快速的侧向扩散和旋转扩散（围绕与双分子层垂直的轴进行）。

问题：在流动镶嵌模型中，哪种运动受到限制？

各组分从双分子层的一个面到另一面的运动（即翻转）是不能进行的。如发生，在一定时期，脂和蛋白质的极性区域必须通过双分子层的疏水区，而这个过程为热力学不稳定过程。

问题：脂的翻转运动的限制对膜结构有怎样的影响？

膜通常表现为脂和蛋白质在双分子层的两侧分布不对称，有大量证据可证明这点。例如，PC 和鞘磷脂主要存在于双分子层的外侧，而 PE 和 PS 主要存在于内侧。单向性膜运输的存在表明蛋白质在膜上的分布必须不对称，而且，质膜外侧所含的分子（糖蛋白和糖脂）可将细胞分型，以便被物质循环中的组分识别，这些糖蛋白和糖脂不存在于双分子层的内侧。最近，有证据表明，某些磷脂（如 PS）是由于磷脂移位酶的需能作用而不对称分布的。

问题：温度如何影响膜的物理性质？

如果膜处于低于常温的环境中，脂双分子层将变为非液态，当温度升高，烃链变得无序，膜又转为液态。这种可逆转变一般发生在 10℃ 的范围内，转变的中点被称为熔点或转移温度，在特定组织内，其值比环境温度略低几度，并且还依赖于①烃链的长度及其不饱和度和②脂的头部基团的性质。

熔点依赖于脂的头部基团的性质表明各种头部基团之间具有相互作用。这点可由人造膜中 PC 比 PE 易动证实。当为 PE 时，氢键由相邻分子的 $-NH_3^+$ 和磷酸生成，而 PC 分子所含的基团 $-N^+(CH_3)_3$ 较大，与 $-NH_3^+$ 相比，不易与磷酸生成氢键，因没有强烈的排斥力，所以紧密地排列，这样就导致了较强的可动性。

当分离时，许多整合蛋白仍保留所结合的脂分子。在完整的膜中，蛋白质和其周围脂质的物理缔合作用限制了二者的移动性。除去脂，会影响蛋白质结构和功能的完整性。

问题：在生理温度下，胆固醇的存在如何影响膜的性质？

胆固醇降低了周围脂质的运动性，因为胆固醇是一种刚性结构，与其相邻分子的烃链有高度的亲和力。而且，胆固醇深深镶嵌在膜内部，其羟基水平于相邻的脂的酯键，因此羟基便与脂的极性头部产生氢键。一般地说，富含胆固醇的膜其水的渗透性降低。

膜的糖蛋白

细胞膜表面的糖与蛋白质相连形成糖蛋白，是细胞被其他细胞识别的标志。细胞膜表面的糖常常通过 *O* -糖苷键与丝氨酸或苏氨酸残基连接（第 3 章），或通过 *N* -糖苷键与天冬酰胺残基的侧链相连。糖蛋白的 N 端所连接寡糖通常有一个含 5 个残基的公共“核心”，如图 6-9 所示，其中两个为 *N* - 乙酰葡糖胺残基，三个为甘露糖残基。核心可以连接另外的甘露糖残基（高甘露糖型）或各种糖的混合物，如 *N* -乙酰葡糖胺、半乳糖、*N* -乙酰神经氨酸和果糖等（复合型）。因为有大量不同的单糖可供选择、几种连接的可能性和两种异头构型，因此，糖蛋白存在大量可能的结构。

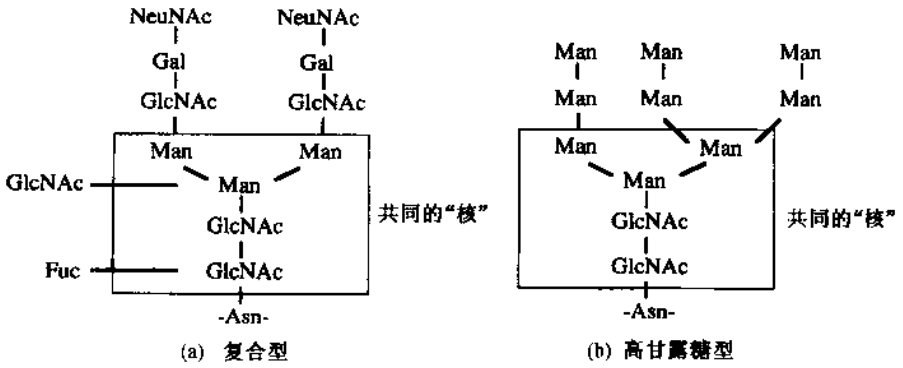


图 6-9　糖蛋白的 N 端连接寡糖：(a) 复合型，(b) 高甘露糖型

问题：糖蛋白的结构为什么具有多样性？

大量的多样性提供了巨大的信息容量，使细胞识别的复杂机制成为可能。

例 6.9

我们可以相信，哺乳动物衰老的细胞或流动的糖蛋白可通过血管组织内唾液酸酶引起的 *N* - 乙酰神经氨酸（唾液酸）的丢失而识别。暴露于末端的半乳糖残基能被某些细胞的脱唾液酸糖蛋白受体所识别并与其结合，这些细胞能够通过胞吞作用的方式使载有脱唾液酸糖蛋白的细胞或蛋白质内在化并降解。

例 6.10

植物和一些细菌可产生众所周知的蛋白质 - 凝集素，它们能够特异性地与某种类型的寡糖结合。刀豆球蛋白 A 是从刀豆中分离的凝集素，它能识别和结合于非还原性 a -甘露糖组成的寡糖。细菌附着于宿主组织，如大肠杆菌，通过细菌凝集素识别和连接于宿主细胞表面的特定糖位点上。这种类型的识别机制解释了细菌疾病的组织特异性。

6.12 运输

膜主要作为机械屏障，将环境分为两个水相。通过极性脂类的二维疏水双分子层的作用，膜抑制了溶质从一相到另一相的自由运动。不同物质简单扩散的速率有很大变化。例如，在穿过典型膜时，下列物质依次按照简单扩散速率降低的顺序排列：氧、苯、甘油、葡萄糖、天冬氨酸、血红蛋白。简单扩散的速率取决于物质的状态（气体扩散最快）、大小（分子越小，扩散越快）和极性（极性越大，扩散越慢）。在没有气体的定量条件下，简单扩散仅在大量疏水分子的运输中起重要作用。少数膜可以允许较大范围的物质，包括极性化合物进行快速的简单扩散。

问题：一些膜允许某些溶质非选择性地进入，其机制是什么？

一些膜上有管孔。许多亲水性化合物（一般为 M_r 小于 600 的化合物）能自由地穿过含有管孔的膜，这些膜包括线粒体的外膜和革兰氏阴性细菌的细胞膜。膜上的管孔是由称为孔蛋白的蛋白质形成。

大多数膜没有允许溶质快速扩散的非极性管孔，并且，对这些膜而言，溶质的简单扩散是一个非常缓慢的过程。如果通过载体介导的转运，溶质穿过这些膜将会快得多。膜上介导转运的组分为蛋白质，这些蛋白质被称为载体或通透酶或转运蛋白。移位酶有时也用，但应尽量避免，因为移位酶也指参与蛋白质生物合成中的酶。

溶质转运的载体是特异性的。一系列载体使细胞能快速吸收各种所需物质和除去多余物质。出于同样原因，细胞将有用物质保留而将不需要的化合物置于细胞外。如没有适当载体的存在，简单扩散就成为这些化合物穿过膜的惟一途径。

决定一种特定化合物穿过膜的运动的性质尽管是简单的实验（如 pH 和温度对转运速率的影响），但确定一个载体如何在分子水平上操作却很困难。

问题：为什么很难确定载体转运的机制？

如要很有效地研究载体的性质，必须将载体纯化。而纯化载体必须将其与膜分离，因此，膜就会被破坏，这样导致载体生物活动所依赖的膜的性质将不存在。这个难题可通过将纯化的载体结合到人造小泡上克服。

例 6.11

可应用放射性标记溶质的方法测定这种溶质进入细胞（或人造小泡）的转运速率。将细胞悬液在含放射性溶质的培养基内孵化，在不同时间取出部分细胞悬液，测定冲洗过滤后细胞的的放射性。图 6-10 表明冲洗细胞的放射性随时间的变化规律。曲线开始部分的斜率即为溶质的吸收速率（在溶质浓度由放射性引起之后），当时间为 0 时，溶质浓度为 $[S]_0$。

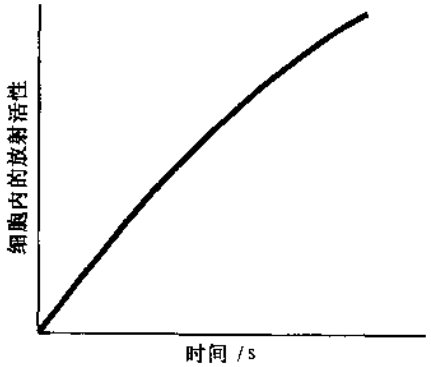


图 6-10

问题：是否存在与上述方法相似的实验人为构造？

存在。在细胞内，溶质可以代谢，所以它在细胞内的实际浓度低于应用放射性方法测定的浓度。如果细胞内已有溶质，测定的吸收速率即为净值，因为溶质通过某些运动（简单扩散和载体转运）到达了细胞外。这些问题通过非代谢类似物可部分解决，例如，在研究葡萄糖的转运时，可用放射性的 2 -脱氧葡糖或 a -甲基葡糖苷。

在研究细菌的转运时，可用另一种方法解决溶质的代谢问题。即选用细菌的突变型，此突变型能转运溶质但缺乏一种或多种代谢这种溶质的酶。

问题：应用类似物的方法有一个什么缺陷？

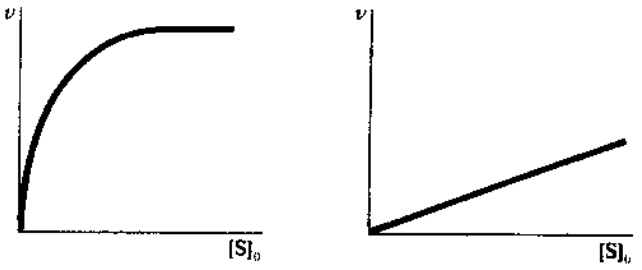
我们所研究的化合物如葡萄糖的精确转运速率不能确定，尽管可以假设转运速率与用类似物时接近。

问题：如果能够测定一种溶质进入细胞的转运速率 v，在（a）载体介导的转运和（b）简单扩散时 v 是如何随溶质的浓度 $[S]_0$ 的变化而改变？

载体介导的转运［图 6 - 11（a）］中，膜上有一定数量的载体分子。当 $[S]_0$ 低时，这些载体仅有部分与溶质结合，但当 $[S]_0$ 高时，绝大多数载体与溶质结合，此时 v 有最大值 V_{max}。简单扩散时［图 6 - 11（b）］，没有载体，v 随 $[S]_0$ 的升高而升高，因为跨膜的浓度梯度决定扩散的速率，而当 $[S]_0$ 高时，溶质穿过膜的浓度梯度比 $[S]_0$ 低时大。

数学方程式能够解释图 6 - 11 的曲线（见第 9 章）。图 6 - 11（a）的曲线可用一个直角双曲线描述。

$$v = \frac{V_{max}[S]_0}{[S]_0 + 常数} \tag{6.1}$$



(a) 载体介导的转运　　(b) 简单扩散

图 6 - 11　转运速率依赖于溶质浓度

描述图 6 - 11（b）的方程式为

$$v = \frac{常数}{l}[S]_0 \tag{6.2}$$

l 表示膜的厚度。（在推导上述方程式时，假设在膜的一侧没有溶质，而另一侧溶质的浓度为 $[S]_0$。）

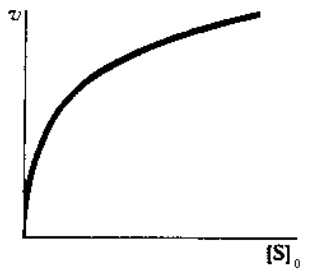


图 6 - 12

问题：假设在一个转运实验中，载体介导的转运和简单扩散同时进行，怎样能证明这种现象？

v 对 $[S]_0$ 所作的图表明 $[S]_0$ 不饱和，除非简单扩散相对于载体介导的转运忽略不计。见图 6 - 12。但当 $[S]_0$ 高时，难以测定 v。例如，为了到达高 $[S]_0$，有的溶质可能没有完全溶解。溶质穿过膜的复合过程可用一个双倒数图说明。（见第 9 章）

例 6.12

方程式（6.1）和（6.2）的转化形式为

$$\frac{1}{v}=\frac{1}{V_{max}}+\frac{常数}{V_{max}}\frac{1}{[S]_0} \quad 和 \quad \frac{1}{v}=\frac{l}{常数}\frac{1}{[S]_0}$$

以 $1/v$ 对 $[S]_0$ 作图，简单扩散和载体介导的转运均为直线［图 6－13（a)］。二者同时进行的双倒数图见图 6－13（b)。

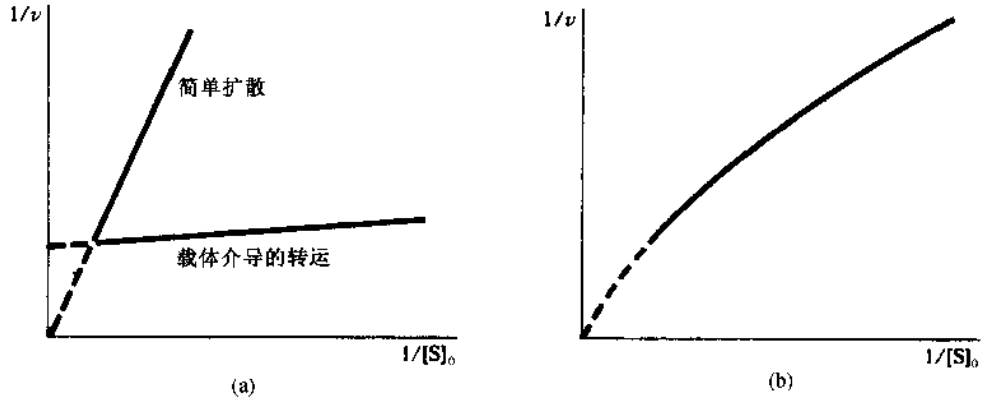


图 6－13

如果溶质分子有一个手性原子，可用另一种方法将简单扩散和载体介导的转运加以区别。简单扩散在两种对映体时均可发生，且扩散速率相同。但载体介导的转运需要溶质固定的立体专一性，换句话说，载体只能识别对映体中的一种。

问题：在细胞膜上，载体的识别（结合）位点是D-葡萄糖还是L-葡萄糖？

D-葡萄糖能被载体识别，因为D-葡萄糖在自然界存在。L-葡萄糖不被识别，因为几乎没有载体进化的生物体系存在。

问题：在什么条件下（a）简单扩散和（b）载体介导的转运将停止？

（a）当膜两侧溶质浓度相同时，简单扩散将停止。

（b）某些载体介导的转运系统同简单扩散一样，当膜两侧溶质浓度相同时，净转运停止。而另外一些系统即使当膜两侧溶质浓度相等，溶质的转运仍可进行。

前面的问题表明，载体介导的转运系统有两种类型：①易化扩散（膜两侧的溶质浓度可以相等）和②主动转运（溶质的转运可以逆浓度梯度进行）。

例 6.13

图 6－14 列出溶质穿过膜的几种方式。［S］和［s］分别代表溶质的高浓度和低浓度。

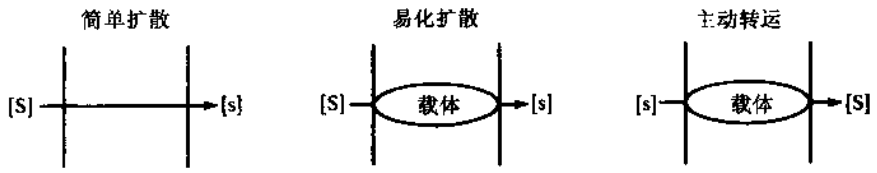


图 6－14

简单扩散和易化扩散是自发的过程，溶质顺浓度梯度运动（即从高浓度到第浓度），直到平衡状态。这两个过程的自由能变化 ΔG 为负值（第 10 章），因为溶质的分布变得无序。因此，这样的过程不需要能量。

$$\Delta G = 2.3RT\lg\frac{[s]}{[S]} \tag{6.3}$$

平衡时，[s] = [S]，$\Delta G = 0$。

主动转运时，溶质浓缩于膜的一侧。这个过程不是自发的，因为 ΔG 为正值，此时载体介导的转运必需某种形式的能量，所以称为主动转运。

问题：主动转运浓缩某种溶质的能力是无限的吗？

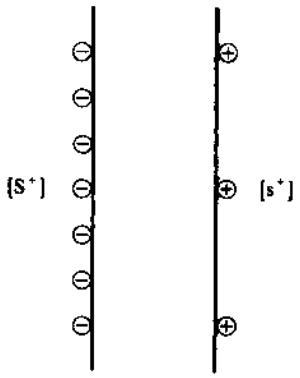


图 6-15　[S⁺] 和 [s⁺] = 平衡浓度。请注意膜上负电荷比正电荷多

不是。如果溶质的浓度在膜的一侧达到较高浓度，溶质将通过简单扩散渗漏到另一侧。膜两侧溶质的浓度差越大，简单扩散的速率越快。事实上，浓度比率很少超过几百比一，通常都要小得多。

如果膜上有易化扩散的载体，溶质同样会扩散到浓度低的一侧。所以，简单扩散和易化扩散是双向的，而主动转运为单向的。

问题：当简单扩散或易化扩散或二者同时进行时，离子化溶质穿过某种类型的膜的运动并不总使膜两侧离子浓度相等。这点如何解释？

如果存在跨膜电势差，达平衡时离子化溶质分布不均匀（图 6-15）。ΔG 不仅依赖于溶质的浓度，还与跨膜的势差 $\Delta\Psi$ 相关（第 10 章）。

$$\Delta G = 2.3RT\lg\frac{[s^+]}{[S^+]} + ZF\Delta\Psi$$

Z 代表溶质的净电荷，F 代表法拉第常数。

主动转运时必须提供能量。初级主动转运过程所需的能量要么来自 ATP 的水解，要么来自电子在电子传递链上的传递（见第 10 章）。次级主动转运，其能量是由两种运动的结合提供，即离子顺浓度梯度运动与溶质的逆浓度梯度运动。离子梯度是在初级主动转运时建立的。基团转运是一种特殊的主动转运方式，物质在跨膜运输时进行了化学修饰，例如，接受一个化学基团。基团转运也消耗能量，因为化学基团的转移是高能化合物裂解的结果。

例 6.14

图 6-16 示意了主动转运的三种类型，能量来源假设为 ATP。符号 [s]、[i⁺] 和 [S]、[I⁺] 分别代表低浓度和高浓度的溶质和离子。AX 为一个化合物，它的 X 基团（如一个磷

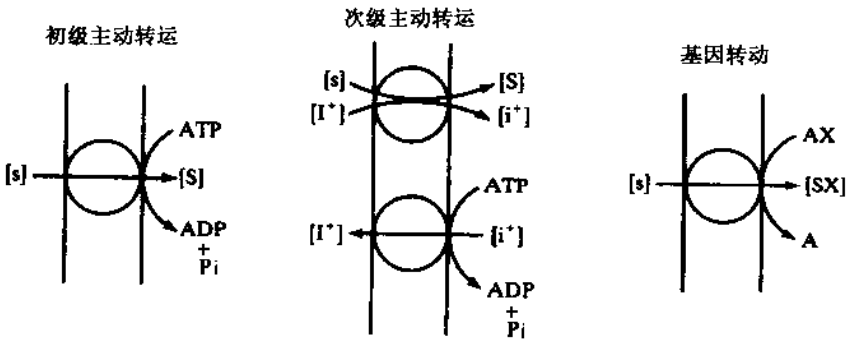


图 6-16

酸）转移到溶质上形成 SX。

转运系统的一些例子列于表 6.4 中。

表 6.4 载体介导的转运系统

溶质	转运类型	发生于
葡萄糖	易化扩散	多数动物细胞
ATP 出-ADP 进	易化扩散	线粒体
H^+	初级主动转运（利用 ATP）	胃上皮
Na^+ 出-K^+ 进	初级主动转运（利用 ATP）	动物细胞
葡萄糖	次级主动转运（Na^+ 协同转运）	一些动物细胞
葡萄糖	基团转运	许多细菌

6.13 跨膜转运的分子机制

参与特定溶质跨膜转运的蛋白质具有两个性质：①与溶质结合的能力和②进行向量过程的能力，即将溶质从膜的一侧运送到另一侧的单向过程。

问题：有哪些简单的方法能进行向量过程？

1. 转运蛋白能表现为活动载体，例如一个大的跨膜蛋白能够旋转，如图 6-17 (a)，或一个小的蛋白能够穿越膜，如图 6-17 (b)。
2. 转运蛋白能够形成一个管孔或通道，如图 6-17 (c)。

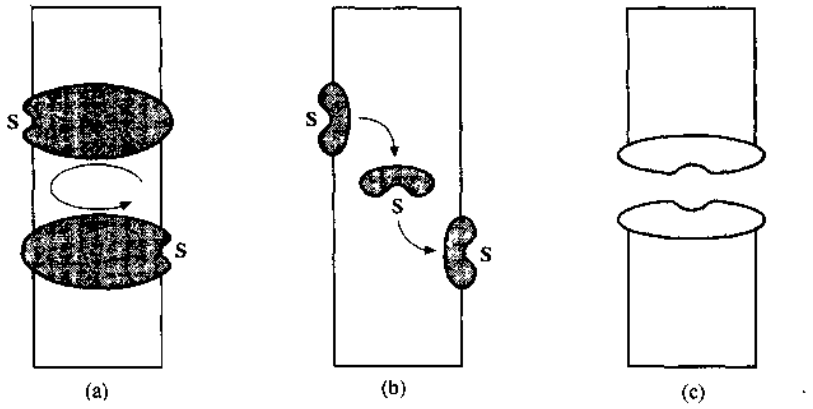


图 6-17

在上述问题中提出的两个概念是难点。其一是分子的极性部分穿过脂双分子层的非极性部分较为罕见，另一个是活动载体的概念在热力学领域不被支持。尽管非特异性通道存在于某些膜内，但管孔的概念只在下列情形被接受：即管孔有一个门，能使转运蛋白特异性地通过，并且只允许溶质以特定转运类型要求的方向运动。管孔的概念可以通过假定转运蛋白是寡聚蛋白质的方式而界定，寡聚蛋白的亚基之间的空间形成了充满水的通道，此通道被连接的亚基包围（图 6-18）。溶质与蛋白质结合将引发构象的改变，从而引起蛋白质亚基相对位置的变化，这样就打开了通道。这就是易化扩散过程。如果不是简单的蛋白质和溶质的结合，而是由于代谢能消耗引起的构象改变，就为主动转运过程。迄今，转运系统结构的实验

研究能够支持形成离子通道时管孔的概念，还能够支持某种转移性 ATPase 的活动载体假说。

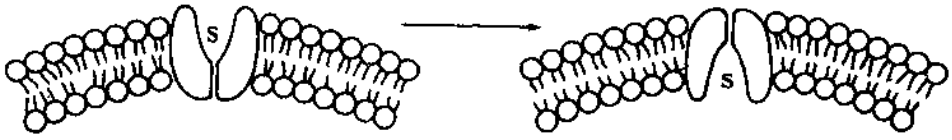


图 6－18　管孔蛋白的构象变化允许溶质发生转运

允许阳离子转运的人造系统已可插入自然膜和人造小泡中。这些人造系统被称为离子载体，有两种类型，分别以短杆菌肽 A 和缬氨霉素为例。

1. 短杆菌肽 A 是由 15 个氨基酸组成的抗生素：

CHO—NH—L-Val—Gly—L-Ala—D-Leu—L-Ala—D-Val—L-Val—D-Val—L-Trp—D-Leu—L-Trp—D-Leu—L-Trp—D-Leu—L-Trp—CONH(CH_2)OH

因其疏水性，短杆菌肽 A 能穿过脂双分子层；两分子短杆菌肽 A 形成头-尾二聚体，此二聚体扭曲形成中空的螺旋结构，其中有 6 个螺旋，总长为 3 nm，大约是穿过脂双分子层疏水区域的距离。螺旋结构是通过分子内多肽链上肽键之间的氢键而稳定。疏水侧链位于螺旋的外侧，螺旋中心是亲水通道，能允许阳离子通过。这种类型的离子载体是非特异性的，阳离子与短杆菌肽 A 结合不紧密。

2. 缬氨霉素也是一种离子载体，但与短杆菌肽 A 不同：(a)当其插入膜或小泡中时，只能特异性地转运 K^+，而不能转运其他离子；(b)缬氨霉素转运 K^+，只能发生在膜的相变温度之上，而短杆菌肽 A 转运阳离子对温度不敏感。

缬氨霉素是一个由 12 个氨基酸残基组成的环状结构，其基本单位是四个氨基酸的结构，重复 3 次便形成缬氨霉素：

┌—NH—(L-Val—D-HyV—D-Val　L-Lac)$_3$CO—┐

其中 D-HyV 代表 D-羟基异缬氨酸，L-Lac 为乳酸盐。此结构由于连续的酰胺键和酯键而稳定。

问题：缬氨霉素转运 K^+ 的可能机制是什么？

因为缬氨霉素特异性地转运 K^+，所以与短杆菌肽形成通道不同，它必须与离子结合。因为只有当膜为液态时，转运才能进行，又因为缬氨霉素是一个小分子，所以缬氨霉素-K^+ 复合物一定能穿过膜。换句话说，缬氨霉素就像一个活动载体。可以想象，环状结构的烃侧位于外侧，使之与脂双分子层的烃部分亲和。结构的内部含有 12 个由酯和酰胺形成的羰基，其中 6 个与 K^+ 协调地位于结构的中心(图 6－19)。

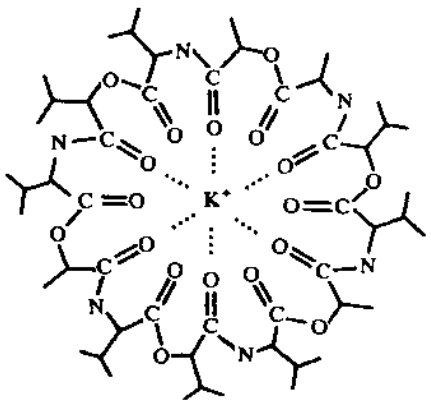


图 6－19　通过缬氨霉素与 K^+ 结合

表 6.5 质膜受体

受体类型	实例	自然配体	功能
配体控制的离子通道	烟碱 (Na^+、Ca^{2+}通道)	乙酰胆碱	神经肌肉接点的激活
	GABA(A) (Cl 通道)	γ-氨基丁酸盐	脑中神经传递的抑制
	兴奋性氨基酸 (Na^+、Ca^{2+}通道)	谷氨酸盐	脑中神经传递的激活
	P_{2x}嘌呤核苷酸受体 (Na^+、Ca^{2+}通道)	ATP	脑中神经传递的激活
G-蛋白结合受体 (结合 GTP 的蛋白质与受体连接、激活了细胞内的酶)	毒蕈碱受体 (5 个亚型)	乙酰胆碱	减缓心率;释放胰腺消化酶
	肾上腺素能受体 (三种 α1 亚型;三种 α2 亚型;三种 β 亚型)	肾上腺素、去甲肾上腺素	提高血压(α1);提高心率(β1);提高空气流进和流出肺(β2)
	血管紧张素受体	血管紧张素 II	提高血压(通过收缩小动脉)中性白细胞;提高细菌的细胞内杀伤力
	白三烯 B_4 受体	白三烯 B_4	血管平滑肌的内皮依赖性舒张
	P_{2Y}嘌呤核苷酸受体	ATP、UTP	
生长因子受体(这类受体可分为两类:受体酪氨酸激酶[1]和与细胞质酪氨酸激酶有关的受体[2])	胰岛素 1	胰岛素	降低血糖;促进葡萄糖以糖原贮存于肝脏和骨骼肌,以脂肪贮存在脂肪细胞内
	表皮生长因子[1](EFG)	EFG	促进细胞分化和排列
	干扰素[2](INF)(几种亚型)	INFα、β、γ	促进淋巴细胞的分化和增殖
	生长激素[2]	生长激素	促进各类组织的生长

6.14 信号

细胞膜是细胞内外液体的重要屏障。信号机制的发展进化使细胞对来源于神经末端(神经性传递)、内分泌腺(内分泌传递)或相邻细胞(旁分泌传递)的化学信使作出响应。

两种基本形式的信号能被识别。

1. 亲水性化学信使能扩散穿过质膜。细胞内的信使分子与特异性受体(结合蛋白质)相互作用。在配体结合状态下,这些受体调节特异性信使 RNA 的转录,进而控制关键酶、受体或透性酶的表达。
2. 有些化学信使因其低脂溶性,不能穿过质膜。这些信使特异性结合到质膜受体上(整合膜蛋白)。在配体结合状态下,受体不是激活①内部离子通道(离子化受体)就是激活②酶的确定序列(代谢转动受体)。表 6.5 为质膜受体的实例。

核受体

这些受体主要与类固醇激素如皮质醇、甲状腺激素和维生素 A 等的生理效应有关。它们是具有同样基本结构的蛋白质,其基本结构是由一个配体结合域和一个 DNA 结合域(由锌指模式构成)组成,它们起到配体应答转录因子的作用(参见第 17 章的进一步讨论)。

例 6.15

肾上腺素能受体为含有三个重要功能域的核蛋白：C 末端区域结合类固醇激素(配体)，DNA 结合域由两个锌指模式组成，N 末端区域参与基因的转录调节(图 6-20)。

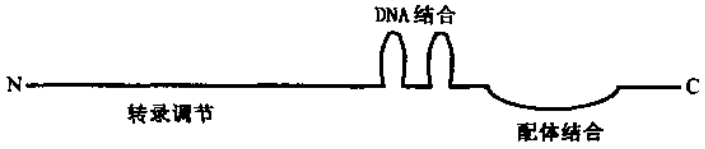


图 6-20　肾上腺素能受体的结构

质膜受体

离子化受体(配体闸门离子通道)

化学信使改变了作为离子(例如 Na^+、K^+、Ca^{2+}、Cl^-)运动通道的整合膜蛋白的构象。兴奋性的神经递质如谷氨酸盐、乙酰胆碱和 ATP 激活了配体闸门离子通道，促使 Na^+ 和 Ca^{2+} 进入，使神经元去极化(激活)。另一方面，抑制性的神经性递质如 γ-氨基丁酸盐(GABA)促进了 Cl^- 进入，使神经元超极化(失活)。

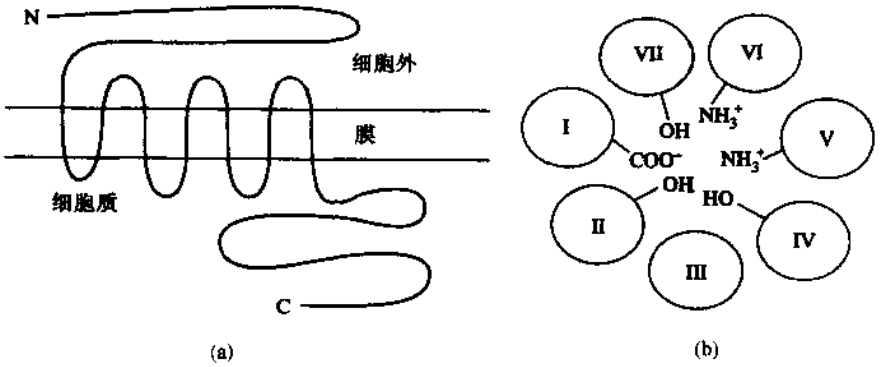


图 6-21　G-蛋白偶联受体的图解。(a)G-蛋白偶联受体的部分穿透膜说明了它的 N 端位于细胞外，有七个跨膜区域，它的 C 端在细胞质内。(b)上图 G-蛋白偶联受体的跨膜区域的图示说明了氨基酸侧链怎样形成一个精确的配体结合位点。此例中配体结合位点是由一个羧基侧链、两个氨基侧链和三个羟基侧链形成

代谢转动受体(G-蛋白偶联受体、生长因子受体)

G-蛋白偶联受体应答于惊人种类的激活剂，包括短肽、蛋白质、生物胺、核酸、脂类甚至光量子！它们是单一亚基的整合膜蛋白，有以所谓“螺旋轮”形式构成的七个跨膜区域的共同结构[图 6-21(b)]。

通过氨基酸侧链，配体结合位点形成于膜表面或靠近膜表面，面氨基酸侧链凸出嵌入由跨膜区域形成的中心空洞[图 6-21(b)]。处于配体结合状态时，这些受体激活了胞质鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(又称 G 蛋白)，又依次激活了一种或多种关键酶的活性。G 蛋白由三个不相同的亚基(αβγ)组成。α 亚基与一分子的 GDP 或 GTP 结合，GDP 结合形式没有活性。受体的配体结合位点的占据启动了鸟嘌呤核苷酸的交换反应，即 GDP 被 GTP 取代(图 6-22)。激活的 α 亚基会从 βγ 亚基上脱离，这是信号转动过程中的关键，因为自由的 α 亚基和 βγ 亚基结合于受体的下游酶，并将它们激活。α 亚基也有酶活性，通过它的鸟嘌呤核苷酸结合位点上的 GTP 转变为 GDP，α 亚基内部的 GTP 酶限制了其自身活性的持续。

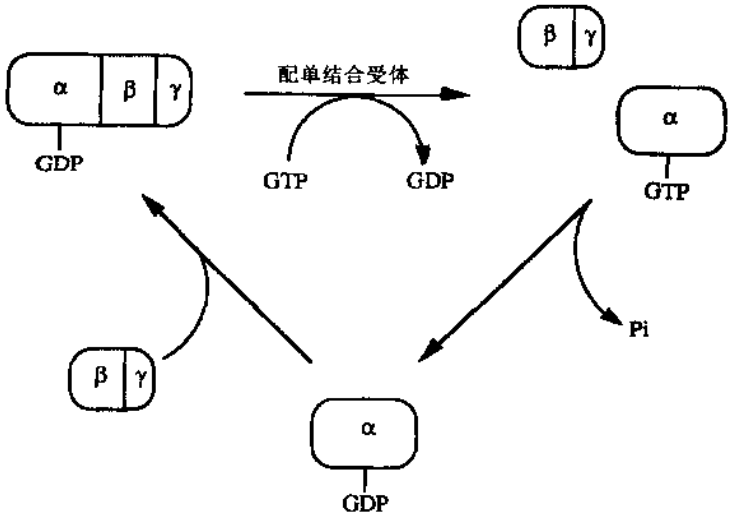


图 6-22 异三聚体 G 蛋白激活和钝化的循环。配体结合受体作为鸟嘌呤核苷酸交换因子,将 α 亚基上的 GDP 以 GTP 取代,然后 α-GTP 和 βγ-GTP 亚基分离,激活了下游目标酶。这个循环是通过 α 亚基的内部 GTP 酶活性完成。自由的 α-GDP 亚基和 βγ 亚基重新聚合形成没有活性的 αβγ 异三聚体。G 蛋白的激活表示在信号通道中位点的扩增。因为膜中每个配体都结合受体分子,所以估计有上百或上千个 G 蛋白分子被激活

例 6.16

霍乱毒素通过灭活小肠内部 GTP 酶活性而干扰了关键的 G 蛋白的功能,其后果为信号转导途径的不可抑制的激活,此途径能产生第二信使 3′,5′-环化 AMP,从而导致伴随离子激活和水分泌的致命腹泻。

问题:有多少 G 蛋白偶联受体存在?

目前还不清楚。但同源分子克隆技术使都含有七个跨膜区域模式的上百种受体逐一区分。许多这些受体的功能和配体还未知,这样的受体被称为"孤儿"受体。同样,也有大量不同种类的 G 蛋白存在,特别是已发现 30 多种不同的 α 亚基。

通过 G 蛋白的酶调节

G 蛋白激活酶与细胞膜表面关系不大,或在细胞质中不存在。G 蛋白主要作用于两种形式的底物:①细胞质内的核苷酸和②质膜内侧的甘油磷脂。

例 6.17

G 蛋白偶联受体调节核苷酸代谢酶

腺苷酸环化酶可催化 ATP 生成腺苷 3′,5′-环化单磷酸(cAMP),它能被激活 G 蛋白的受体 Gs(刺激性 G 蛋白)激活,又受到激活 G 蛋白的受体 Gi(抑制性 G 蛋白)的抑制。cAMP 水平的提高是糖元释放葡萄糖的基础,而肾上腺素和胰高血糖素可以诱导葡萄糖的释放(见第 11 章)。

cGMP 磷酸二酯酶可催化鸟嘌呤 3′,5′-环化单磷酸(cGMP)生成 GMP,G 蛋白转导素(Gt)激活 cGMP 应答于视网膜视杆细胞质膜上的光感受器的激活。光诱导的 cGMP 水平的抑制关闭了视杆细胞膜的 Na^+ 渗透通道,导致膜的超极化和视网膜上神经传递的减少。强光下,大脑会阻断这种神经传递的抑制。

G蛋白调节磷脂酶

甘油磷脂易于受在各个位点由磷脂酶介导的攻击。在某些情况下，磷脂酶对特殊的水溶性头部基团具有特异性：如PI-特异性磷脂酶C。其他情形时，各种类型的磷脂酶参与攻击磷脂，如磷脂酶A_2。磷脂酶A_2、C和D的某些同种类型可被G蛋白(Gi、Go、Gq)激活。其结果是，质膜的内侧是各种化学中介体的来源，这些化学中介体作为受体激活的产物被释放，它们包括肌醇1,4,5-三磷酸和1,2-二酰甘油，二者均为PI-特异性磷脂酶C的产物(图6-23)。这些受体还包括花生四烯酸，它是磷脂酶A_2和磷脂酸(磷脂酶D的一种产物)的生同产物。IP_3诱导Ca^{2+}离子从细胞内质网的贮藏中释放。DAG是脂依赖性丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶(蛋白激酶C)的激活剂。

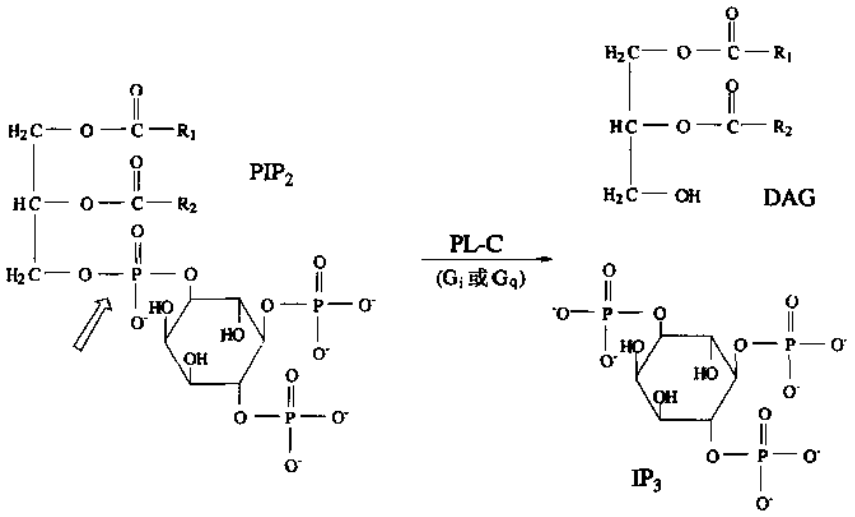


图6-23　通过磷脂酶C水解磷脂酰肌醇4,5-二磷酸。磷脂酶C(PC-L)被G蛋白的α亚基和(或)β亚基激活。图中中空的箭头即水解位点。水解后可得到两种水解产物：能激活蛋白激酶C的1,2-二酰甘油和诱导Ca^{2+}从细胞内释放的肌醇1,4,5三磷酸(IP_3)

生长因子受体

某些能够调节细胞代谢和基因转录激活受体的生长因子如表皮生长因子(EGF)和血小板生长因子(PDGF)，在细胞质内具有内部蛋白激酶活性(图6-24)。这种内部蛋白激酶活性特异性地使蛋白质中的酪氨酸残基磷酸化。当没有配体存在时，酪氨酸激酶受体没有活性，但当配体与细胞外表面结合后，则被激活，这时，酪氨酸残基发生磷酸化作用，其作用部位为①受体自身存在的细胞质区域(自磷酸化作用)和②关键的细胞质蛋白质。这种类型的受体部分以单亚基形式存在，激活后形成二聚体(例如表皮生长因子受体，见下)。另一部分受体由多亚基组成，通过二硫键的连接而稳定(例如胰岛素受体)。细胞质区域受体的磷酸化因蛋白质装配的目的产生了模板，此模板能激活被称为RAS的单体G蛋白。RAS的激活在丝氨酸和苏氨酸特异性蛋白激酶的激活之前，这样影响了基因转录和细胞骨架重排。所以这些都是细胞分化和增殖的基础。

问题：磷酸化反应时蛋白质具有什么性质？

磷酸化作用是自然界调节关键酶活性的共同机制。蛋白激酶是作用于蛋白质或肽类底物的ATP磷酸

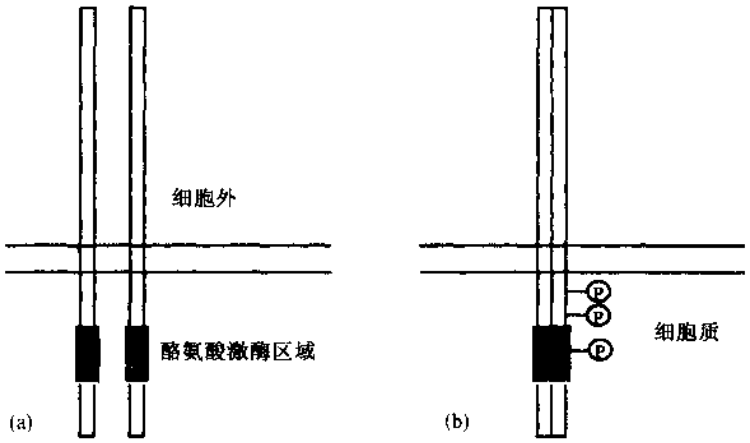


图6-24 表皮生长因子(EGF)受体的示意图。该受体为含有一个跨膜区域的整合膜蛋白。配体结合位点位于细胞内,细胞质内靠近C端有一个酪氨酸激酶区域。(a)静止时,受体以单亚基形式存在。(b)与EGF结合时,受体通过非共价缔合作用形成二聚体。之后激活的酪氨酸激酶将细胞质内的酪氨酸残基磷酸化,进而募集更多的蛋白质与受体结合。细胞质区域内蛋白装配的结构对激活那些调节细胞代谢和基因转录的酶很必要

转移酶。一般而言,蛋白激酶分为两类:一类是将丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化(例如cAMP依赖性蛋白激酶),另一类则使酪氨酸残基磷酸化(例如EGF和胰岛素受体)。前一种情况下,ATP的末端磷酸转移到了丝氨酸和苏氨酸的羟基上,后一种情况,则特异性地转移到酪氨酸的羟基上。

问题:蛋白质怎样与酪氨酸激酶受体的磷酸酪氨酸残基连接?

特异的肽序列如SRC同源-2(SH-2)区域,与富含磷酸酪氨酸的序列相结合。这个结合反应允许关键蛋白质与激活的受体酪氨酸激酶和RAS激活的装配复合物相互作用。

其他生长因子通过一个家族的单一跨膜区域受体发出信号,这些受体激活了细胞内酪氨酸激酶,但却不能在细胞质区域由它们自己表达酪氨酸激酶的活性。几种细胞因子(淋巴和骨髓细胞功能的肽调节器)和几种激素的受体就属于这个家族,如生长激素、促乳素和红细胞生成素。配体与受体结合后,细胞质酪氨酸激酶的JAK(Janus激酶)家族成员结合到受体的细胞质区域并且被激活。JAK酪氨酸激酶能调节关键的细胞质酶和转录因子的STAT家族成员。

细胞内介体在信号转导通道中的作用

质膜受体在配体或"第一"信使(神经递质、激素等)将携带的信息由细胞外传递到细胞内的过程中具有重要作用。然而,细胞信号也需要信息在细胞内的传递。携带调节离子通道、酶或受体活性信息的分子被称作"第二"信使。

但是,基于信号转导级联的复杂性,也许专有名词"细胞内介体"更适合,因为信号转导级联中一个"第二"信使的水平能够调节另一个"第二"信使的水平。

例6.18

生长因子受体的细胞内介体可以调节细胞骨架和基因转录,它们包括酪氨酸激酶(例如受体性酪氨酸激酶或JAK激酶)、关键的结合蛋白、磷脂修饰酶及其产物、单体G蛋白(如RAS)

和下游丝氨酸和苏氨酸蛋白激酶(例如 MAP 激酶)。许多生长因子通过鸟嘌呤核苷酸交换激活 RAS 是激活下游信号通道的关键。

G 蛋白偶联受体的细胞内介体包括 cAMP、cGMP、Ca^{2+}、IP_3、DAG、花生四烯酸和磷脂酸。这些介体通过调节离子通道(如 cAMP、cGMP、Ca^{2+}、花生四烯酸)、丝氨酸和苏氨酸激酶(如 cAMP、cGMP、Ca^{2+}、DAG、磷脂酸、花生四烯酸)或转运子(如 IP_3)的活性而调节细胞代谢。细胞内介体调节并参与信号转导通道。例如,Ca^{2+} 与 Ca^{2+} 结合蛋白即钙调蛋白协同地激活由细胞内磷酸二酯酶(PDE)作用的 cAMP 和 cGMP 降低。受体激活蛋白激酶以相似的方式作用于受体的钝化(减量调节)。例如,通过 β-肾上腺素能受体激酶(BARK)的作用,将 β-肾上腺素能受体磷酸化,就降低了 β-肾上腺素能受体应答肾上腺素的能力。

问题:Ca^{2+} 是怎样作为细胞内介体的?

静止状态下,细胞质中自由 Ca^{2+} 的浓度保持在一个低水平(大约 0.1 μmol/L),大约是血浆中(1.1 mmol/L)的万分之一。但是随着某种受体的激活,细胞质中自由 Ca^{2+} 浓度可以提高 10 或 100 倍。IP_3 从膜磷脂中的释放是一种提高 $[Ca^{2+}]_i$ 的机制,而 IP_3 应答于某种 G 蛋白偶联受体的激活。某种离子化受体的激活同样通过刺激 Ca^{2+} 从外部流入而提高 $[Ca^{2+}]_i$,一旦 $[Ca^{2+}]_i$ 提高,Ca^{2+} 就激活关键的细胞内酶,如蛋白激酶 C 的激活,作用方式为可以是直接激活,但当 Ca^{2+} 与高亲和 Ca^{2+} 结合钙调蛋白(16 700 kDa)结合后,就间接激活。Ca^{2+}-钙调蛋白能够激活包括特异性蛋白激酶在内的关键酶。Ca^{2+} 的水平可通过几种方式恢复到正常水平,这些方式包括①质膜内的转运 ATP 酶将 Ca^{2+} 运到细胞外,或②转运 ATP 酶将 Ca^{2+} 运到内质网的内部。

问题:cAMP 怎样激活它的蛋白激酶?

环化 AMP 蛋白激酶(PK-A)具有 $\alpha_2\beta_2$ 亚基结构(图 6-25)。α 亚基具有催化活性,四聚体的 $\alpha_2\beta_2$ 复合物没有活性。每一个 β 亚基上有两个 cAMP 结合位点。

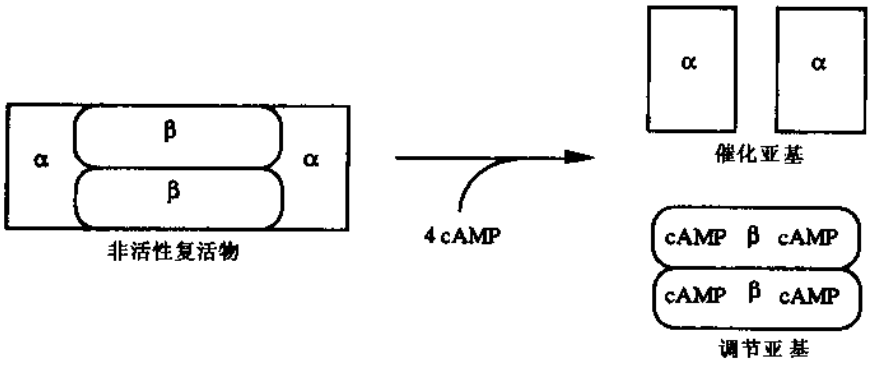


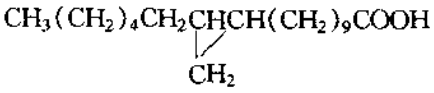
图 6-25　由 cAMP 活化 cAMP 蛋白激酶

cAMP 存在时,两个游离的 α 亚基就从复合物上释放,四分子 cAMP 就结合到剩余的 β_2 同型二聚体上形成 $\beta_2(cAMP)_4$。PK-A 的游离 α 亚基磷酸化蛋白将作用于 MgATP 存在的情况下。

问题解答

脂的分类

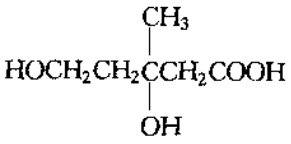
6.1 乳杆菌酸($C_{19}H_{36}O_2$,一个环丙烷脂肪酸)的熔点是高于还是低于与之相同C链长度的线性饱和脂肪酸?



答:

熔点低于线性饱和脂肪酸,环丙烷基团降低了分子规则排列的倾向。乳杆菌酸和19:0脂肪酸的熔点分别为28℃和69℃。

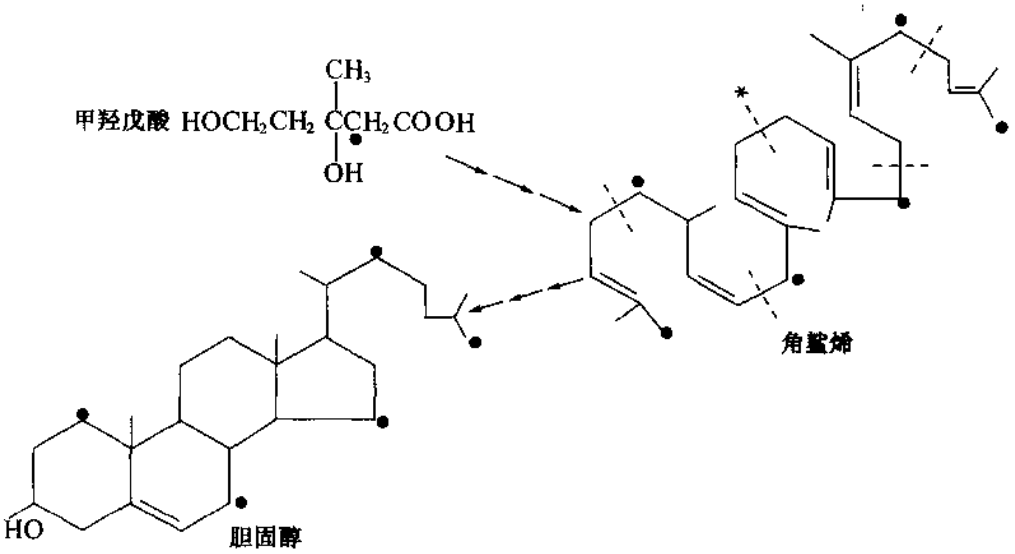
6.2 如果将以α碳原子放射性标记的甲羟戊酸提供给合成胆固醇的组织,那么合成的胆固醇哪一个碳原子将被标记?



甲羟戊酸

答:

自然界中,固醇是由角鲨烯合成的,所以固醇最初是由异戊二烯合成。甲羟戊酸是异戊二烯单位的中间前体,当两个甲羟戊酸分子头尾相连时,羧酸基团就以二氧化碳释放。因此,如果甲羟戊酸的α碳原子被标记,那么这个碳原子总是连接于带有侧链甲基的碳原子上。六个异戊二烯单位连接生成角鲨烯的途径(例6.2)表明异戊二烯单位并非总是头尾相连,角鲨烯是一种点对称结构(下面的结构中此点用*标记)。这一点两侧的三个异戊二烯单位是头尾相连的,而它们彼此却是头-头连接,请见给出的标记模式图。



脂在水中的行为

6.3 含有短链烃的磷脂是否能形成双分子层?

答：

不能，它们只能形成微团(参见6.7的第15个问题)。形成双分子层的磷脂其烃链至少要含有6个碳原子。

6.4　请解释为什么酰基化离子具有去污剂的性质？

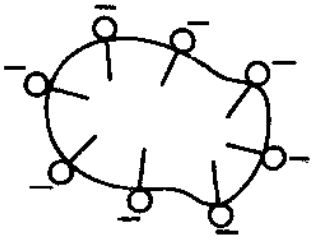


图6-26

答：

酰基化离子具有两亲性，并且烃链能渗透脂肪(疏水性的)微粒，留下了离子化的微粒在表面(图6-26)。这样，微粒就像微团，能迅速地溶解在水中。脂肪酸的钠盐和钾盐就是肥皂。肥皂在硬水中的去污效果不佳，因为水中的钙离子会导致微团的聚集和沉淀。二价钙离子就像两个微团间的桥梁，但因为一个微团是多价的，相对于大量肥皂，少量的钙就可引起所有微团聚集在一起。

膜

6.5　离子去污剂和非离子去污剂，哪一个能更好地溶解膜上的整合蛋白？

答：

离子去污剂改变了整合蛋白疏水部分的构象，而非离子去污剂可溶解膜并形成去污剂-脂-蛋白质的混合微团，这个微团中蛋白质的构象没有发生变化。因此，非离子去污剂的效果更佳。但是，从混合微团中除去脂和去污剂将会引起蛋白质构象的改变及其生物学活性的丢失。整合蛋白需要被溶化的脂包围，以便使蛋白质活性的丢失更具效力。

6.6　如果将细菌突然从25℃的环境转移到35℃，细菌将采用什么对策来恢复它们的膜流动性？

答：

细菌能够结合到它们的磷脂脂肪酸内，这样脂肪酸就比开始①更长、②更饱和或③更少分支。

转运

6.7　在研究D-葡萄糖进入的转运时，L-葡萄糖有什么用处？

答：

L-葡萄糖能用于区别简单扩散和载体介导的转运。L-葡萄糖只能通过简单扩散转运。D-葡萄糖和L-葡萄糖吸收速率之差表现为D-葡萄糖的载体介导的转运的速率，因为葡萄糖转运蛋白对D-葡萄糖具有立体选择性。

6.8　装有缓冲液的六个试管中，每管都加入50 μl大鼠肝脏线粒体悬液，悬液内含20 mg ml^{-1}蛋白质，每管再加入放射性标记的丙酮酸(0.07 mCi $mmol^{-1}$)。每管每隔5秒分别依次加入α-氰-3-羟肉桂酸(一种转运的抑制剂)。每个试管中的溶液在加入抑制剂后立即过滤，在5、10、15、20、

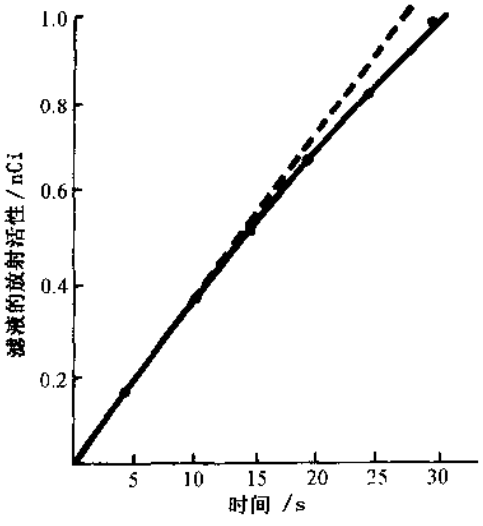


图6-27

25和30秒加入抑制剂时，获得的滤液（保留着线粒体）的放射性分别为0.17、0.35、0.51、0.66、0.82和0.96 nCi。请问丙酮酸的吸收速率为每分钟每毫克蛋白多少nmol?

答：

滤液放射性可以衡量分离时线粒体内丙酮酸的多少。以含有丙酮酸的线粒体悬液的培养时间为横坐标，以滤液的放射性为纵坐标作图（图6-27），可以得到一条曲线。丙酮酸的初始吸收速率可以从曲线的切线的斜率获得，其值为2.1 nCi min^{-1}。这代表丙酮酸的吸收速率为每秒30 nmol，因为1 mmol的丙酮酸有0.07 nCi的放射性。每个试管内含50 μl的线粒体悬液，所以每个试管有1 mg蛋白质。因此，丙酮酸的吸收速率为30 nmol每秒每毫克蛋白质。

6.9 假如有两种独立的载体参与一种溶质转运进入细胞内，并且简单扩散可忽略不计，怎样证明两种载体的存在?

答：

两种载体的存在可以通过测定溶质在不同浓度下（$[S]_0$）的吸收速率（v）证明。两种载体存在时，为图6-28的双倒数图。也见第九章。

图6-28

信号

6.10 细胞外肾上腺素（来源于肾上腺髓质）在脂肪细胞内激活β_3-肾上腺素能受体，导致三酰甘油裂解为游离的脂肪酸和甘油。参与这个过程细胞内酶——激素敏感性脂酶被蛋白激酶A激活。请问什么是信号转导级联中的关键因子?

答：

肾上腺素能受体属于G蛋白偶联受体家族。信号转导级联中的关键因子为：Gs、腺苷酸环化酶、3′,5′-环化AMP和蛋白激酶A。

6.11 哪一类受体作用最快，哪些受体作用较慢?

答：

一般而言，作用最快的是那些参与最少分子步骤的的受体。配体闸门受体通道在几微妙内就对它们的激活剂作出响应。依赖于G蛋白偶联受体的效应一般在几秒内可观察到。核受体需要基因转录、信使RNA翻译成蛋白质、翻译后修饰过程和某种情况下细胞周期性的翻转，其结果是这些受体的效应几小时甚至几天都不明显。生长因子受体激发了初期和后期事件。初期事件的产生是细胞内酶活动的结果，例如一些磷脂修饰酶。而基因转录的效应导致了后期事件发生。

6.12 将人类嗜中性粒细胞暴露于肿瘤助催化剂乙酸肉豆蔻佛波醇（PMA，100nmol/L）下，在得到一个稳定的代谢状态后，细胞悬液变得均匀。离心后，收集膜和离心上清液。膜和离心上清液也可不通过细胞暴露于PAM而制备。两种情况下也均收集了匀浆样品（即在离心之前收集）。之后测定各部分的蛋白激酶C的活性，得到以下数据：

	匀浆%	膜%	上清液%
对照细胞	100	10	90
PMA-处理细胞	100	60	40

注：所有数据均是与对照匀浆相变的百分比值

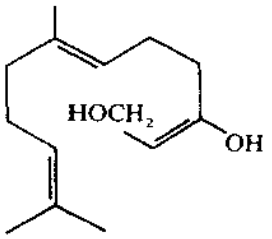
请问怎样最简单地解释这些数据?

答：

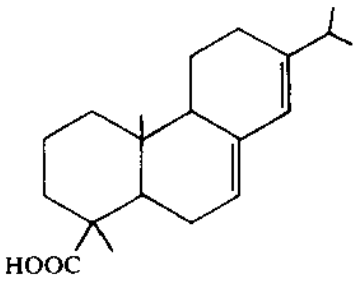
PAM 处理后，匀浆内的蛋白激酶与对照匀浆相比，恢复到 100%，但发生了蛋白激酶的重新分布。蛋白激酶 C 被 PMA（或被其自然激活剂 DAG 或 Ca^{2+}）激活后，被运输到质膜，在膜上蛋白激酶 C 将靶蛋白质磷酸化。

补充问题

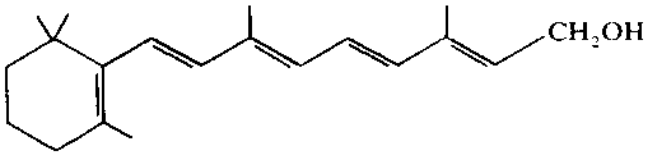
6.13　请指出生成下列化合物时异戊二烯单位共同连接的途径：



(a)　法尼醇



(b)　枞酸



(c)　维生素 A

(d)　樟脑

6.14　(a)怎样定义糖脂？(b)请举出两个例子。

6.15　为什么几乎所有自然界存在的脂肪酸都含有偶数个碳原子？

6.16　请写出下列脂肪酸的结构：

(a)豆蔻酸(14:0)

(b)肉豆蔻烯酸($14:1^{\Delta 9}$)

(c)蓖麻油酸($18:1^{\Delta 9}$ C－12 羟基化)

6.17　甘油和四种不同的脂肪酸可以构成多少种不同的三酰甘油分子？

6.18　写出两个三酰甘油的结构，在 37℃时，一个为(a)固态，另一个(b)为液态。

6.19　pH7 时，将下列脂类的混合物进行电泳：PE、PS、PG、DPG，说明这些脂类是向阳极运动，还是向阴极运动或保持不动？

6.20　请绘制胆固醇的结构以表明其构象。

6.21　将 1－棕榈酰－2－硬脂酰－3－肉豆蔻酰甘油和磷脂酸的苯溶液分别与等量体积水剧烈振荡。当两相分离后，哪一个脂在水相中浓度较高？

6.22　1 μm^2 的磷脂双分子层区域有多少个磷脂分子？假设一个磷脂分子占用的表面积为 0.7 nm^2。

6.23　从 4.74×10^9 人体红细胞细胞膜中分离的脂以面积 0.89 m^2 的单分子层延伸。假设红细胞是直径 7 μm、厚 1 μm 的圆盘，说明包围红细胞的细胞膜必须是双层脂分子厚。

6.24　为什么磷脂酰乙醇胺优先进入 PE 和 PC 组成的人造小泡的内侧？

6.25　预测下列操作将对小泡的相变温度及其对磷脂运动性的影响，其中小泡是由二棕榈酰磷脂酰胆碱制成。

(a)将二棕榈酰磷脂酰胆碱引入小泡

(b)将高浓度胆固醇引入小泡

(c)将整合膜蛋白引入小泡

6.26 请计算由30%(重量)的蛋白质(密度为1.33g cm^{-3})和70%重量的磷酸甘油酯(密度为0.92g cm^{-3})组成的膜的平均密度。

6.27 问题6.26中的膜,每一分子蛋白质对应多少分子的脂?假设磷酸甘油酯和蛋白质的平均分子质量分别为800和40 000。

6.28 下列化合物穿过生物膜的简单扩散的顺序是什么:丙酸、1,3-丙二醇、丙酰胺、1-丙醇、丙氨酸?

6.29 在*E. coli*中,葡萄糖是以基团转运方式吸收,乳糖以次级主动转运(利用H^+)吸收,而甘露糖的吸收是通过结合蛋白系统。请描述怎样确定蜜二糖(葡萄糖和半乳糖组成的寡糖)能否被*E. coli*吸收。如能吸收,是以上述三种方式中的哪一种进行。

6.30 相同的细胞悬液用不同标记活性的亮氨酸处理。亮氨酸吸收的初始速率可通过细胞悬液测定(见下表)。请问用同种转运系统,细胞吸收亮氨酸的最大速率为多少?

亮氨酸浓度/mol/L	初始吸收速率/cpm*
0.5	55
1	110
5	480
10	830
20	1 300
30	1 700
50	2 100
100	2 600

* cpm表示放射性的单位,为每分的计数。

6.31 胃液的pH为1,而产生胃液的细胞,其内部pH为7。计算37℃时,从这些细胞中转运质子到胃中的ΔG。(R,气体常数,等于8.3 J $mol^{-1}K^{-1}$)

6.32 预计(a)缬氨霉素和(b)短杆菌肽A对葡萄糖转运到小泡内初始速率的影响,这些小泡来源于葡萄糖和Na^+共转运的细胞。假设外部培养基含0.2mol/L Na^+,并且小泡的内部含有相同浓度的K^+。

6.33 在血小板中,蛋白激酶C激活了阻止肌醇1,4,5-三磷酸(IP_3)形成1,4-二磷酸(IP_2)的肌醇1,4,5-三磷酸-5-磷酸单酯酶。这会给激活磷脂酶C的受体引起的Ca^{2+}的释放造成怎样的影响?

7 核酸

7.1 导言

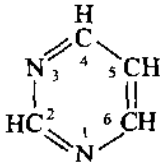
1868年，Friederich Miescher从脓细胞的核中分离出一种物质。这种物质被认为是胞核特征性物质，他称它为核素。接下来，从鲑精头部分离出一种相似的物质。之后得知核素是一种碱性蛋白和一种含磷的有机酸的混合物，现称作核酸。

7.2 核酸及其化学组成

细胞核中主要的核酸为脱氧核糖核酸（或DNA）。DNA含有戊糖——脱氧核糖，脱氧核糖是其化学组分中的一种。现已知DNA是遗传物质。另一类型的核酸是核糖核酸（或RNA），它以核糖代替了DNA中的脱氧核糖。RNA的主要作用是遗传信息从DNA到蛋白质的传递。

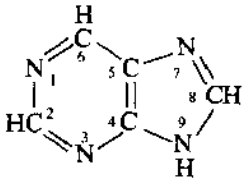
DNA分子非常大，比蛋白质分子大得多。RNA与蛋白质大小接近。用酸将DNA（或RNA）完全水解使DNA分裂为含氮碱基、2-脱氧-D-核糖（RNA时为D-核糖）和正磷酸的混合物。在DNA和RNA中都有两种类型的碱基，嘧啶和嘌呤。

嘧啶是杂环化合物嘧啶的衍生物：



嘧啶

嘌呤是稠环化合物嘌呤的衍生物：



嘌呤

环中位置的编号方式按国际理论和应用化学联合会（IUPAC）的规定进行。

嘧啶

DNA中发现的主要嘧啶为胸腺嘧啶和胞嘧啶；RNA中为尿嘧啶和胞嘧啶。这三种嘧啶的区别在于连接在环上的化学基团的类型和位置不同。

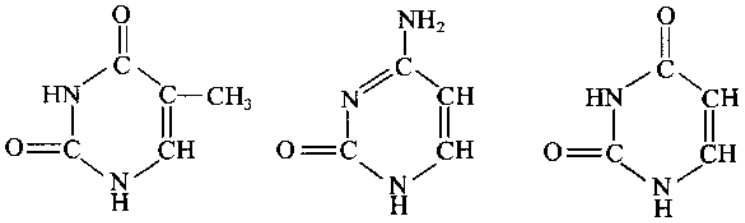
胸腺嘧啶是5-甲基-2,4-二氧嘧啶。

胞嘧啶为2-氧-4-氨基嘧啶。

尿嘧啶为2,4-二氧嘧啶。

例 7.1

写出（a）胸腺嘧啶、（b）胞嘧啶和（c）尿嘧啶的结构。

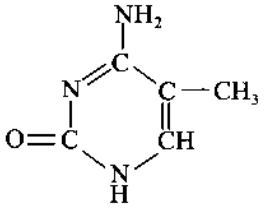


(a) 胸腺嘧啶 (b) 胞嘧啶 (c) 尿嘧啶

胸腺嘧啶也可称为5-甲基尿嘧啶。在一些核酸中还发现其他甲基化嘧啶。

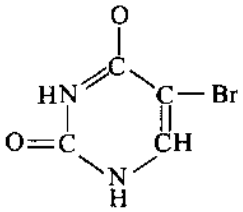
例 7.2

写出5-甲基胞嘧啶的结构。



5-甲基胞嘧啶

DNA和RNA中，胞嘧啶的甲基化作用在遗传物质及其表达的保护方面具有重要的生物学意义。

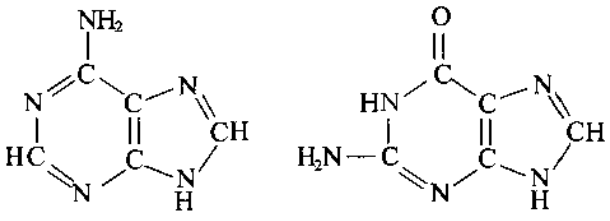


5-溴尿嘧啶

5-溴尿嘧啶是胸腺嘧啶的类似物，区别仅在于C-5的取代基（以溴代替了甲基）不同。这两个取代基占用了几乎一样的空间，负责合成DNA的酶可以接纳任何一个，在某种类型的细胞和病毒中允许5-溴尿嘧啶掺入DNA。这在研究DNA的合成中非常有用。

嘌呤

在DNA和RNA中发现的嘌呤主要为腺嘌呤和鸟嘌呤。二者的区别为连接在嘌呤环上的化学基团的类型和位置不同，如下所示：



腺嘌呤 鸟嘌呤

例 7.3

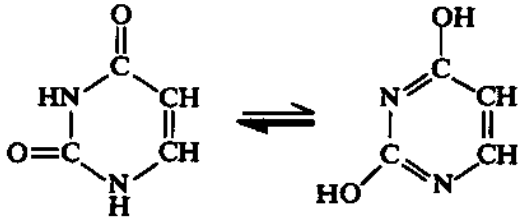
按照嘌呤环上取代化学基团的性质和位置描述腺嘌呤和鸟嘌呤。

腺嘌呤为6-氨基嘌呤。

鸟嘌呤为6-氧-2-氨基嘌呤。

嘧啶和嘌呤的互变异构形式

所有的嘧啶和嘌呤能以互变的异构体形式存在，称作互变异构体。所以，尿嘧啶能以酮式和烯醇式存在。

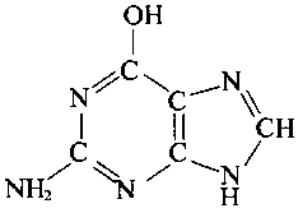


酮式　　烯醇式

粗箭头表示在中性 pH 下，常以酮式的形式存在。

例 7.4

写出鸟嘌呤的烯醇式形式。



鸟嘌呤的烯醇式形式

问题：是否可以写出腺嘌呤的烯醇式形式?

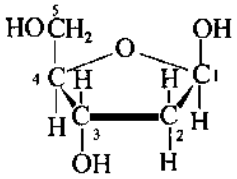
不可以，因为腺嘌呤没有酮基。但是，当其异构为亚氨基形式的互变异构体后，则可以写出烯醇式。但中性 pH 时，氨基形式占优势。

糖

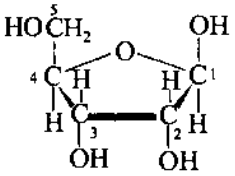
DNA 中的糖为 2 -脱氧核糖，RNA 中为 D -核糖。

例 7.5

写出 DNA 和 RNA 中存在的糖的形式。



(2- 脱氧 -β -D- 呋喃核糖)



(β -D- 呋喃核糖)

注意核酸中的糖均以 β 异头体的形式存在。

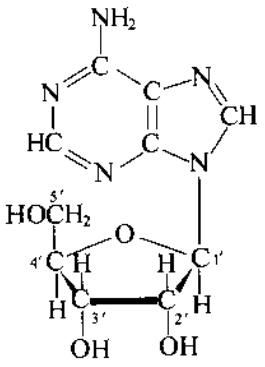
7.3　核苷

在核苷酸的结构中，一个嘧啶或嘌呤与糖（2 -脱氧- D -核糖或 D -核糖）连接后就形成核苷。如果含脱氧核糖，核苷就指脱氧核糖核苷，如含核糖，则指核糖核苷。嘌呤核苷是碱基的 N - 9 和糖的 C - 1 以 β -糖苷键相连，而嘧啶核苷的这种连接是在碱基的 N - 1 和糖的

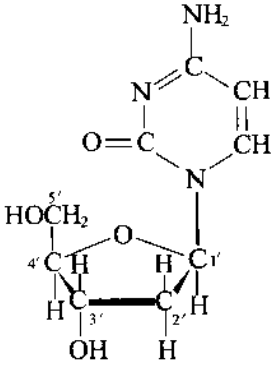
C－1之间。

例 7.6

写出（a）含有腺嘌呤的核糖核苷和（b）含有胞嘧啶的脱氧核糖核苷的结构。



(a) 9-β-D-呋喃核糖腺嘌呤（腺苷）



(b) 1,2′－脱氧-β-D-呋喃核糖胞嘧啶(脱氧胞苷)

因为例7.6中的糖苷键是发生在嘧啶或嘌呤中的氮原子上，因此，这些核苷也称为N－糖苷。为了将呋喃糖环上的原子与碱基环上的原子区别开，呋喃糖环上的原子以1′，2′，…，5′表示，如上图所示。按结构写的化学名称虽然简单明了，但却较难使用，使用简单术语将更方便。因此

腺嘌呤与核糖连接＝腺苷

尿嘧啶与核糖连接＝尿苷

鸟嘌呤与核糖连接＝鸟苷

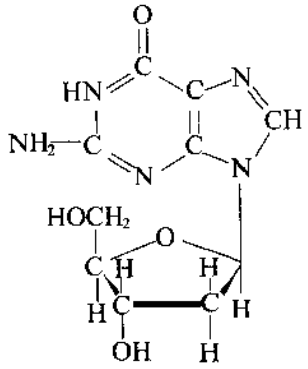
鸟嘌呤与脱氧核糖连接＝脱氧鸟苷

胞嘧啶与脱氧核糖连接＝脱氧胞苷

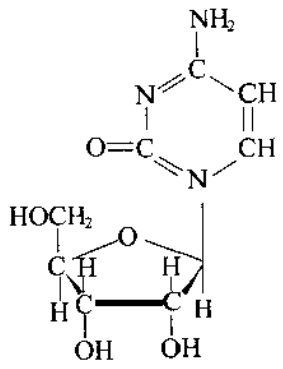
胸腺嘧啶与脱氧核糖连接＝脱氧胸苷

例 7.7

写出（a）脱氧鸟苷和（b）胞苷的结构。



(a) 脱氧鸟苷



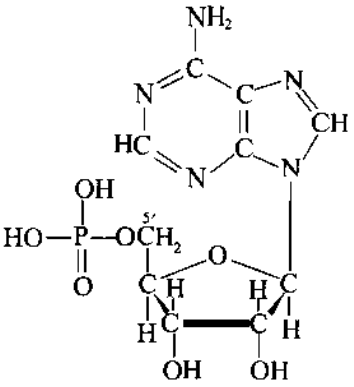
(b) 胞苷

7.4 核苷酸

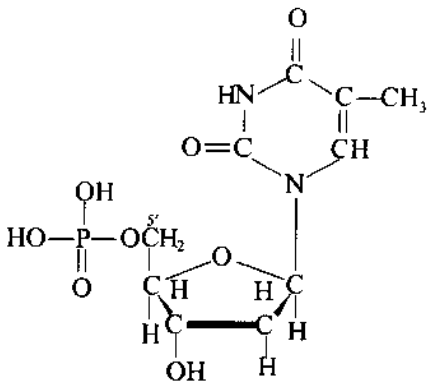
核苷酸是核苷的磷酸酯，磷酸位于C－5′。也有其他位置磷酸化的核苷酸，但却不是核酸的组分。含有脱氧核糖的核苷酸称为脱氧核糖核苷酸，含核糖的则称作核糖核苷酸。

例 7.8

写出（a）含有腺嘌呤的核糖核苷酸和（b）含有胸腺嘧啶的脱氧核糖核苷酸的结构。



(a) 腺苷-5′-磷酸(AMP)



(b) 脱氧胸苷-5′-磷酸(dTMP)

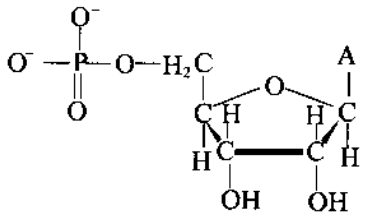
腺苷5′-磷酸也称为AMP（腺苷一磷酸）或腺苷酸。如果腺苷的5′-磷酸上的核糖被脱氧核糖取代，则术语为dAMP或脱氧腺苷酸。一些核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的缩写名称列于下表。

碱基	核糖核苷酸	脱氧核糖核苷酸
腺嘌呤，A	腺苷酸，AMP	脱氧腺苷酸，dAMP
鸟嘌呤，G	鸟苷酸，GMP	脱氧鸟苷酸，dGMP
胞嘧啶，C	胞苷酸，CMP	脱氧胞苷酸，dCMP
尿嘧啶，U	尿苷酸，UMP	脱氧尿苷酸，dUMP
胸腺嘧啶，T	胸苷酸，TMP	脱氧胸苷酸，dTMP

术语名称告诉我们核苷酸是酸，这是磷酸第一次电离的结果，磷酸电离后其pK_a值接近1（第10章）。因此，中性pH时，核苷酸是电负性的。磷酸的第二次电离，pK_a大约为6，这也有助于核苷酸在中性pH时保持电负性。中性pH时，碱基上不带电荷。

例7.9

写出pH7时AMP的电荷形式的结构。

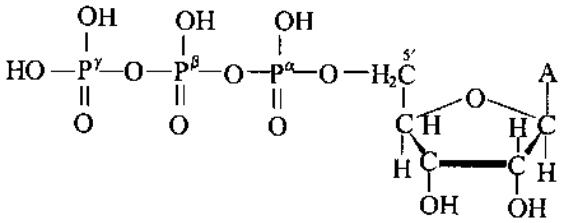


AMP(电荷形式)

注意磷酸上的两个负电荷残基。这个结构中，腺嘌呤以A表示，它不带任何电荷。

所有的5′-核苷酸也以5′-二磷酸和5′-三磷酸的形式存在，它们分别含有两个和三个磷酸。相应的腺苷5′-核苷酸就为ADP和ATP。

例7.10



注意这个结构是以非电荷形式表示。磷原子以α、β和γ标注，α磷与核糖的5′C连接。ADP只含有α和β磷酸。

问题：中性pH时，ATP的净电荷为多少？

ATP为电负性，含－2到 4个净电荷。因为ATP和所有的核苷三磷酸可以从磷酸基团上分离出四个质子，分离出第一个质子，其pK_a大约为1，分离第二、第三和第四个质子，pK_a在6～7的范围内变化。

例 7.11

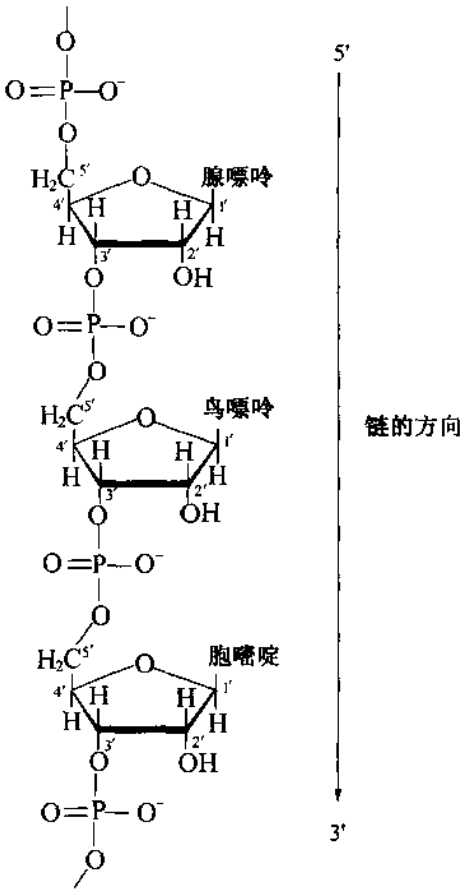
pH7时，以净负电荷增加的顺序排列ATP、dAMP和CDP（胞苷二磷酸）。

其顺序为dAMP、CDP、ATP。因为中性pH时主要是磷酸起作用。分子中所含磷酸越多，所带负电荷越多。

在细胞内，核糖核苷二磷酸和三磷酸（NDP、NTP）与脱氧核糖核苷二磷酸和三磷酸（dNDP、dNTP）具有重要功能。它们是各类反应中能量的载体和核酸合成的前体（第10章和第16章）。

7.5 多聚核苷酸

核酸，包括DNA和RNA，均为多聚核苷酸，它们是以核苷酸（各种类型）为重复亚单位的多聚物。核苷酸通过一个核苷酸的3′C和相邻的另一个核苷酸的5′C之间的磷酸二酯键连接。磷酸二酯键重复多次就形成了含有上百到上百万个核苷酸的巨大分子，见右图。

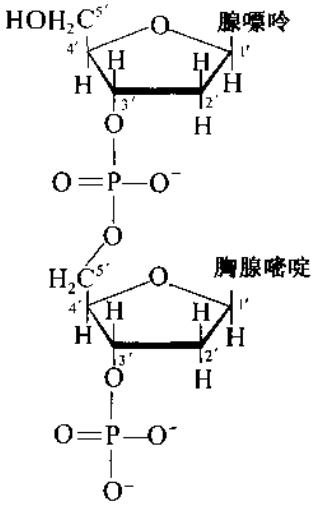


例 7.12

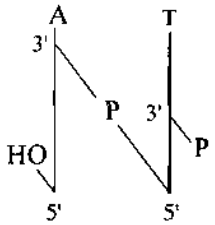
写出一段多核糖核苷酸（RNA）链的结构，这段RNA以腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶核苷酸为顺序。注意这个结构为其电荷形式。因为磷酸二酯键连接了核苷酸的不同C原子，3′和5′碳原子，因此，这个链具有方向性或极性。按照惯例，所示结构具有5′→3′向下的方向（或3′→5′向上的方向），核苷酸的顺序一般按5′→3′方向书写。因此，上述RNA链的一部分的顺序就为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶，或简写为AGC。为了表明结构的5′和3′端均与磷酸连接，更精确的写法为pApGpCp。这种速记形式不能表明这三个核苷酸的序列是更长结构的一部分，pApGpCp还可以表示只含有5′和3′端均被磷酸化的三个核苷酸的分子（一个三核苷酸）。如果表示AGC是多脱氧核苷酸的一段，可用d-pApGpCp的简写形式表示，或用dAGC表示。

例 7.13

写出二核苷酸d-ApTp的结构。



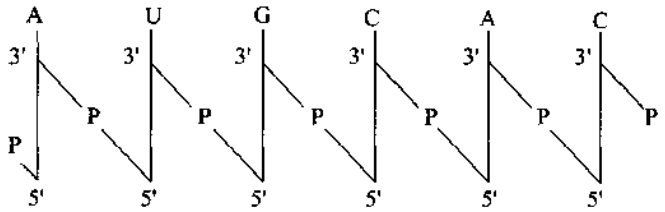
注意 5′端没有磷酸，糖为脱氧核糖。另一种常用的简写形式为



注意后一种形式没有明确糖的性质。

例 7.14

写出 pApUpGpCpApCp 的简写结构。



这个结构包含六个核苷酸单位，被称为六核苷酸。含有少量（10 个或更少）核苷酸的结构被称作寡核苷酸。

7.6　DNA 的结构

DNA 为多脱氧核苷酸，是最大的生物大分子，一些 DNA 分子由超过 10^8 个核苷酸组成。它们含有碱基腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶，遗传信息就是由 DNA 分子整条链精确的核苷酸序列编码。一种最简单的确定 DNA 序列的方法是用酶——DNA 聚合酶，它催化 DNA 的合成。它的性质将在第 16 章讨论。

DNA 的碱基组成

目前已明确各种不同生物的 DNA 的碱基组成，每一种均不同于其他种（见表 7.1）。

问题：人体肾脏的 DNA 的碱基组成是什么？

它与人体肝脏的 DNA 组成相同，请见表 7.1。因为每一种生物的 DNA 碱基组成具有一个特性，而且不会随细胞类型的改变而变化。这反应出核苷酸序列及其编码的遗传信息在一个生物体的不同类型的细胞中相同。但是，这种信息在一个生物体中的各类细胞中表达各异，正如后文所示。

表 7.1 不同生物的 DNA 的碱基组成

来源	碱基组成/mol %			
	G	A	C	T
藤黄八叠球菌	37.1	13.4	37.1	12.4
类产碱杆菌	33.9	16.5	32.8	16.8
大肠杆菌 K12	24.9	26.0	25.2	23.9
小麦胚	22.7	27.3	22.8*	27.1
牛胸腺	21.5	28.2	22.5*	27.8
人肝脏	19.5	30.3	19.9	30.3
酿酒酵母	18.3	31.7	17.4	32.6
产气荚膜梭状芽孢杆菌	14.0	36.9	12.8	36.3

* 胞嘧啶 + 甲基胞嘧啶。

例 7.15

来源于不同种类生物的 DNA，其一种碱基（或一类型的碱基）对另一种碱基的比率是否有共同特征？

所有生物嘌呤（A + G）对嘧啶（T + C）的比率接近相等。更为显著的是 A 对 T 和 G 对 C 的比率接近相等。这两点反应了许多 DNA 分子的结构特征。

DNA 的双螺旋结构

问题：DNA 的什么结构特征导致 A 对 T 和 G 对 C 的比率接近相等？

DNA 是含有两条多核苷酸链的双螺旋分子，两条多核苷酸链彼此通过特异性碱基配对（图 7-1）相连接。一条链上的腺嘌呤和另一条链上的胸腺嘧啶配对，而鸟嘌呤与胞嘧啶配对。这两条链是互补的。这就是 Watson 和 Crick 提出的 DNA 结构的重要特征。相对的配对碱基之间形成氢键。Watson 和 Crick 提出的 DNA 结构中，A:T 和 G:C 碱基对几乎在一个平面上，并以氢键（点划线）相连，如图 7-1。注意 A:T 碱基对之间有两个氢键，而 G:C 有三个。

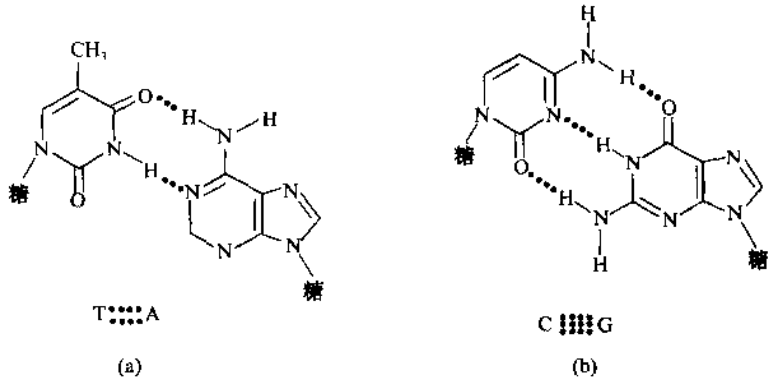


图 7-1 DNA 中的碱基配对

一个碱基对堆积在另一个碱基对之上，碱基对平面垂直于双螺旋的长轴。如图 7-2 所示，可用梯形结构示意图表示 DNA 的结构。

问题：图 7-2 的双螺旋、梯形结构中，为什么两条链是相反的方向？

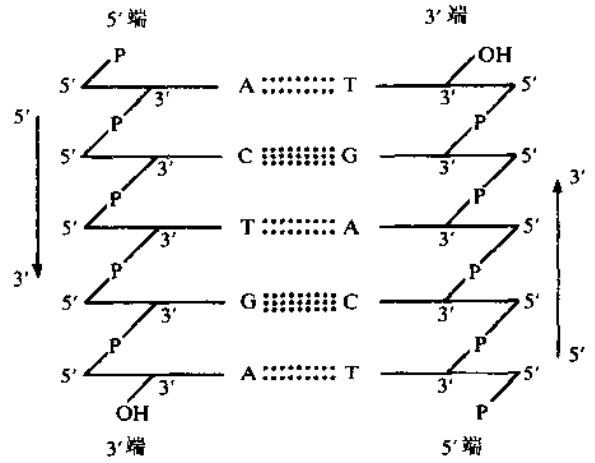


图 7－2　DNA 双螺旋中碱基对的堆积

1953 年，J. Watson 和 F. Crick 将互补链的碱基配对和 X 射线衍射数据进行共同分析，提出了 DNA 的结构模型。这个模型的基本结构是两条链彼此缠绕形成右手螺旋（双螺旋），所确定的结构与当时获得的数据吻合，这个结构中两条互补链方向相反（图 7－3）。但两条链极性相反的直接的证据 10 年以后才获得。

问题：两条链彼此缠绕形成螺旋结构对整个 DNA 分子结构的稳定有什么作用？

每组点划线代表碱基对之间的氢键，这些氢键位于垂直于纸面的平面上。

缠绕形成螺旋的最重要的效应就是使堆积的碱基对距离非常近。B 型 DNA 的螺旋结构中，碱基对的距离为 0.34nm，这个距离称为垂直高度。所以，水从疏水中心中排出，电离的磷酸位于表面。中心的疏水作用同碱基对之间的氢键一起稳定了整个螺旋。还应注意在螺旋中每 10 个碱基对或 3.4nm 形成一个完全的旋转，这个距离称为螺旋的螺距。随着双链分子的旋转，螺旋表面形成两条螺形凹沟，根据其长度，分别称为大沟和小沟。现已知大沟具有调节与蛋白质的相互作用，某些蛋白质能够识别和结合在特异性核苷酸序列上。

问题：图 7－3 所示的双螺旋结构称为 B 型 DNA。DNA 的其他形式是什么？它们是否具有生物学作用？

Watson 和 Crick 所用的 X 射线衍射数据来自高湿度条件下制备的 DNA 纤维。在低湿度（小于百分之 75）条件下，DNA 纤维将缩短。这是 DNA 转变为 A 型的结果，A 型 DNA 的碱基对与螺旋轴不垂直，大约倾斜 20°，11 个碱基对形成一个螺旋，螺距降低到 2.8nm。B 型螺旋在细胞内占优势，双链 RNA 和 DNA/RNA 杂交分子产生 A 型螺旋。

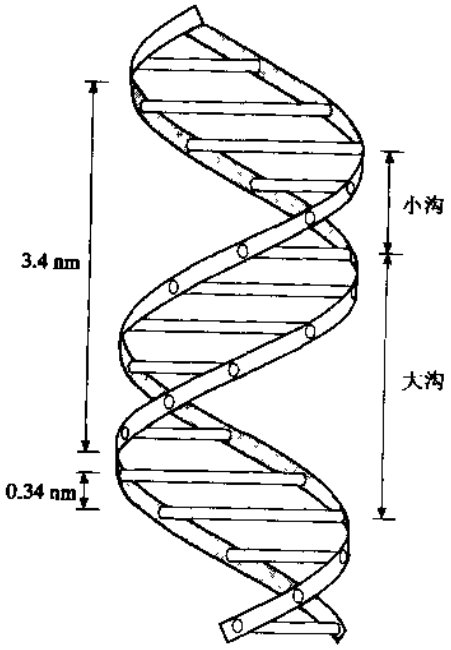


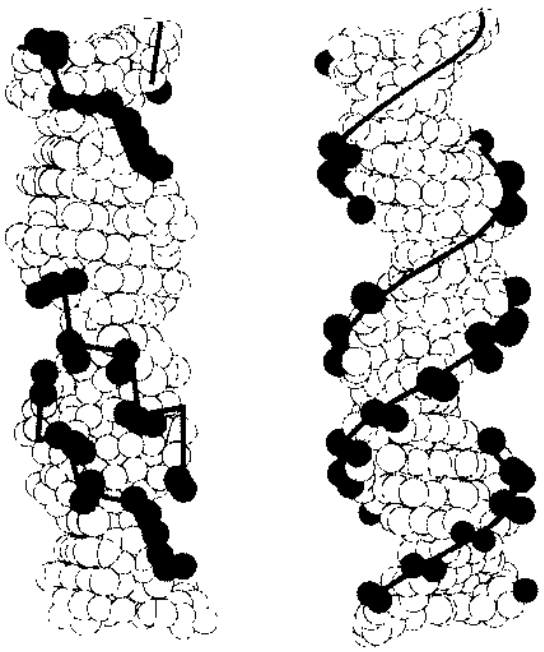
图 7－3　DNA 双螺旋的模式图（B 型）

含有交替嘌呤－嘧啶序列，特别是$d(CG)_n$以及$d(TG)_n$的 DNA，其双螺旋具有不同的形式。它是左手螺旋而非右手螺旋，被称为 Z 型 DNA。DNA 各种螺旋参数的比较列于表 7.2，Z 型和 B 型 DNA 的空间填充模型比较于下（图 7－4）。

表 7.2 DNA 螺旋的比较

螺旋参数	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
螺旋方向	右手	右手	左手
每个螺旋的碱基对数目	11	10	12
每对碱基之距离/nm	0.29	0.34	0.37
螺距/nm	3.2	3.4	3.5

在 Z 型 DNA 中，重复单位是一个双核苷酸，其生成物结构中的糖－磷酸骨架为交错的 Z 字形，它的名称（Z）也是由此而来。Z 型 DNA 也许有重要的生物学作用，但目前我们还不确知。当 $n>25$ 时，序列 d（TG）$_n$ 在真核 DNA 中（在人类基因组中大约为 10^5 个拷贝）普遍存在，但在体内它们是否以 Z 型存在还不确知。



(a) Z型 (b) B型

图 7－4 Z 型和 B 型 DNA

螺旋结构的局部变化

DNA 纤维的 X 射线衍射数据只表示了 DNA 构象中序列变化的平均效应。DNA 的高分辨率研究需要单一 DNA 晶体的 X 射线衍射分析，这只有在确定长度和顺序的纯 DNA 的化学合成之后才可能实现。

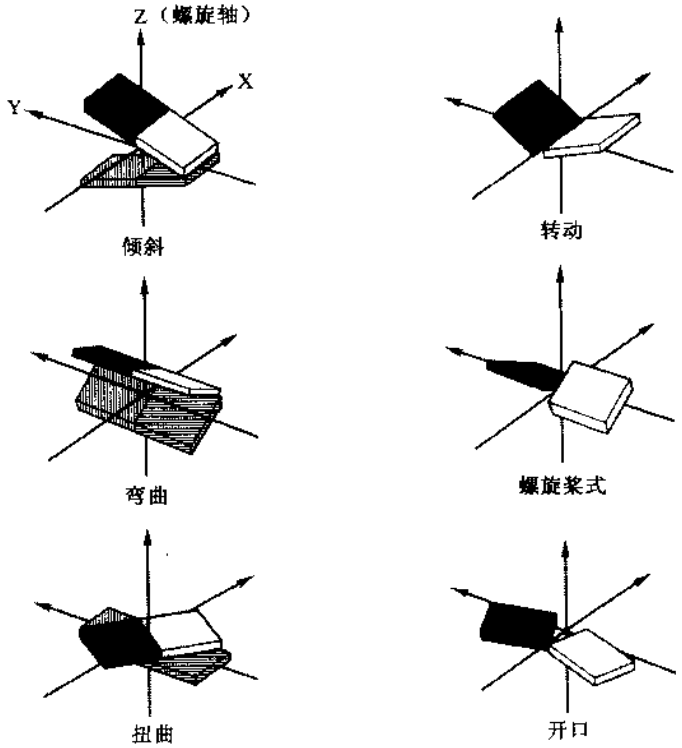


图 7－5 DNA 碱基对几何学中的序列依赖变化

有关碱基组成变化的晶体 DNA 片段的实验表明双螺旋中的变化为序列依赖性变化，并且强调 A、B 和 Z 型是结构不同的 DNA 家族。变化产生在一个碱基对对下一个碱基对的定位中，而这种定位通过以 X 轴、Y 轴和 Z 轴为中心倾斜、转动或扭曲确定的。碱基对中两个碱基的相对转动也将产生弯曲、螺旋桨式和开口等变化（图 7-5）。

表 7.2 所列参数为平均值，例如，尽管 B 型 DNA 的平均碱基对间的距离为 0.34nm，但这个距离实际是在 0.25～0.44nm 的范围内变化。

问题：上述文字描述了什么样的序列依赖性变化？存在于螺旋重复中（每 10～11 个碱基对）的一段序列 dA_n（$n=4\sim6$）将导致 B 型螺旋轴的弯曲。

与之相似，嘌呤-嘧啶-x-x-x-嘧啶-嘌呤-x-x-x 重复序列也将导致弯曲，其中 x 可以为任何碱基。

Z 型螺旋的发现是在序列 dCGCGCG（见上）形成的晶体的研究中发现的。具有这种交替的嘌呤-嘧啶序列的 DNA 片段会导致 B 型螺旋“起皱”，即产生一个较深的小沟。因此，就转变到 Z 型螺旋。

问题：在实验室中，怎样合成寡核苷酸？

DNA 合成的常用方法为亚磷酸三酯法（图 7-6）。一条寡核苷酸链通过一个核苷酸残基的 5′-羟基和下一个的 3′-磷酸之间连续地形成二酯键而生成。第二个核苷酸的 3′-磷酸被二烷基亚磷酰胺（DPA）取代物激活，为与第一个核苷酸的 5′-OH 的反应作好准备。为了避免不需要的连接，第一个核苷酸通过 3′-OH 连接在柱或漏斗中的固体载体（通常为硅胶）上，第二个核苷酸的 5′-OH 被二甲氧三苯甲基（DMT）保护起来。

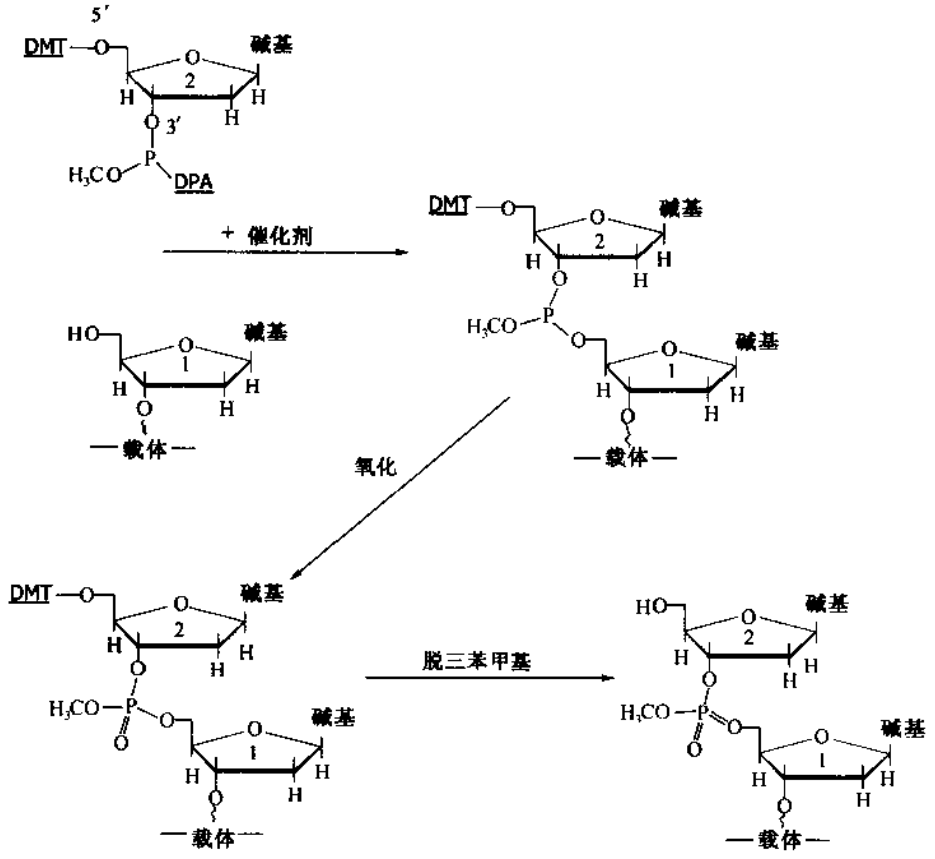


图 7-6　固相寡核苷酸的合成

这个反应产生了亚磷酸二酯，亚磷酸三酯通过充满柱中的碘氧化为磷酸二聚体。接下来，DMT 基团用80%的乙酸（脱三苯甲基作用）处理，将它从第二个核苷酸上除去，为与下一个 DPA-激活的单体反应作准备。这样的循环将持续进行，直到寡核苷酸完全合成。这种循环反应能最多能连接 150 个核苷酸残基。

问题：怎样测定 DNA 序列？

最经常使用的方法称为链终止测序法或双脱氧法，将在第 16 章讨论。

7.7 DNA 的变性

双螺旋 DNA 是相对僵硬和较长的分子，所以 DNA 溶液黏度很高。如果将 DNA 溶液加热到 95℃，黏度显著下降，并使双螺旋结构解体，这就是变性作用，这个过程还伴随着双链分离为柔性的单链。变性和复性作用提供了各种来源 DNA 性质的重要信息。变性作用同样为 DNA 和 RNA 特异序列的精细鉴别提供了基础，并且对分子遗传学快速发展有重要意义。

通过黏度的变化可以检测变性，一个更为方便的检测方法是测定其紫外（uv）吸收值。天然 DNA（双螺旋）和变性 DNA（单链）紫外吸收光谱的差异请见图 7-7。在最大吸收波长（260nm），单链 DNA 的吸收比双链 DNA 高大约 40%。这就是增色效应，是螺旋中的碱基对不再堆积的结果。

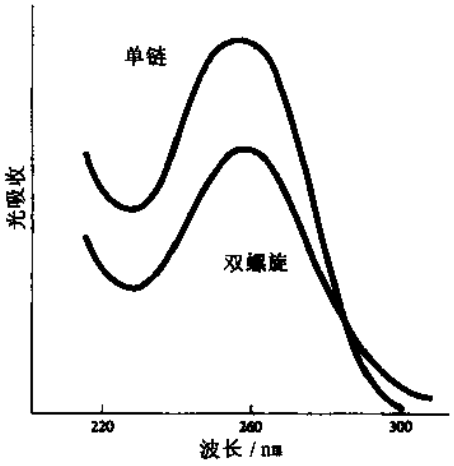


图 7-7

问题：除加热外的其他方法是否能引起 DNA 的变性？

DNA 螺旋是通过每个碱基对之间的氢键和堆积的碱基对之间的疏水力而稳定的。只要是能够减少氢键和降低周围介质极性的试剂，如甲酰胺，均能导致变性。极端 pH 能增加碱基的电荷，因此对变性同样有效。所以，DNA 在 pH12 时，260nm 的光吸收比其天然形式高 40%。

DNA 的热变性

如果将 DNA 溶液的温度逐渐提高，可以通过 260nm 下光吸收的变化反应 DNA 的变性。几种 DNA 的典型结果请见图 7-8。

图 7-8 中的曲线称为解链曲线，因为随着光吸收的上升，高度有序、半圆筒形的双螺旋 DNA 被破坏（或解链）。50% 的 DNA 解链的温度称作熔点，或 T_m。

例 7.16

除热以外的何种其他因素对一种 DNA 的 T_m 有影响？

中性 pH 时，T_m 主要与介质的盐浓度（或离子强度，第 10 章）有关。图 7-8 中的曲线是在离子强度刚好高于 0.15 时取得。如果离子强度降低 90%，所有 T_m 值将降低到 20℃左右。这是增加的负电荷及其导致的增大的静电排斥作用的结果。

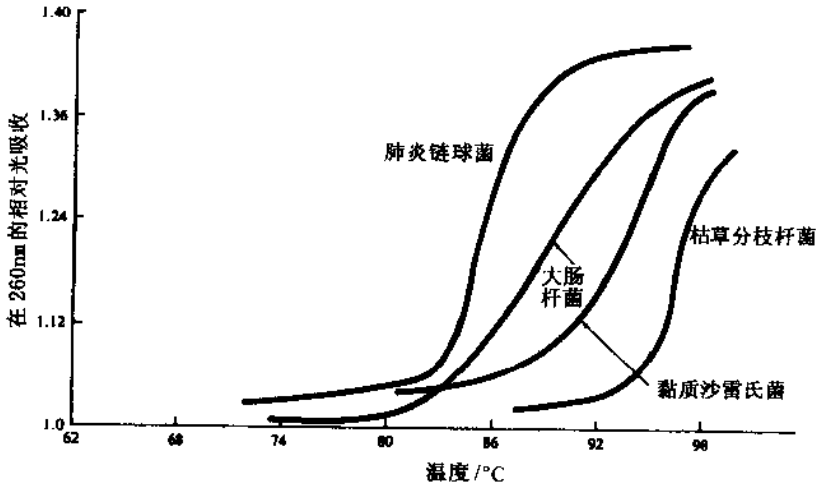


图 7-8　不同种类生物的 DNA 的解链曲线

问题：为什么不同来源的 DNA 的 T_m 值不同?

这是因为 DNA 含有数量不同的 G:C 和 A:T 碱基对，G:C 使螺旋更稳定，也许是因为每对碱基有三个氢键而不是两个（图 7-1）。所以，GC 含量越高，T_m 越高。因此，标准条件下的 T_m 值可用于估算未知 DNA 的 G+C 含量。多种 DNA 的 T_m 对 G+C 含量所作的图请见图 7-9。

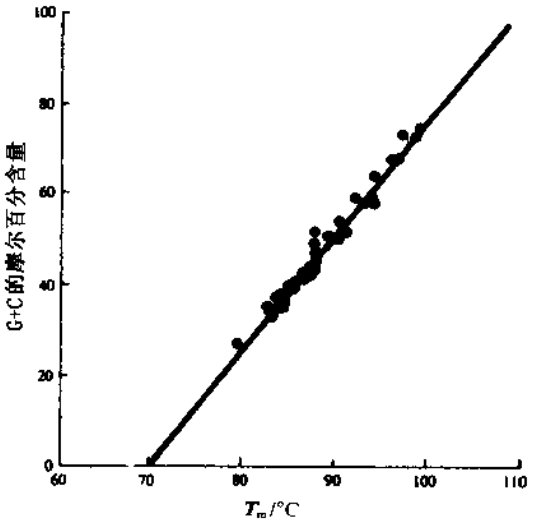


图 7-9　DNA 的解链温度与 G+C 含量的关系

DNA 的复性

当温度低于 T_m 时，热分离的 DNA 互补链自动的重新缔合即为复性作用，也称作退火。

问题：所有类型的DNA的退火速率是否相同？

退火速率主要由互补序列的浓度决定。病毒DNA的数量少于细菌DNA，所以细菌有较高水平的遗传复杂度。相同平均大小和摩尔浓度的病毒和细菌DNA相比，病毒DNA的互补序列浓度较高。因此，病毒DNA比细菌DNA复性快，换句话说，细菌DNA序列异源性更高。

复性速率和序列异源性（或复杂度）可通过COT（时间浓度曲线）定量测定。如果DNA的初始浓度（每升DNA的摩尔数）为C_0，k代表互补链重新缔合的速率常数，单链分子的重新缔合比例将按照下列表达式随时间t降低。

$$f = \frac{1}{1 + kC_0t} \tag{7.1}$$

通常将f对C_0t的COT分析结果作图。几种DNA在固定条件下（DNA的大小、温度、pH、离子强度）的COT分析见图7－10。$f=0.5$时，称C_0t为$C_0t_{1/2}$。

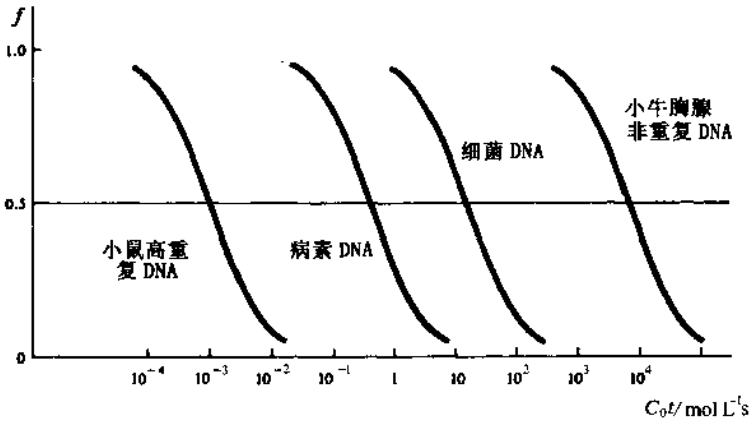


图7－10 各种DNA的COT分析

问题：$C_0t_{1/2}$的不同值代表了什么意义？

速率常数k是一种DNA的特性常数，与DNA序列组成的复杂度有关。$C_0t_{1/2}$是k的倒数，它是衡量序列复杂度的尺度。$C_0t_{1/2}$值越高，DNA分子越复杂。因此，从以上分析可见，细菌DNA比病毒DNA复杂。

问题：上述分析表明，高重复和非重复DNA的含义是什么？

小鼠高重复DNA的$C_0t_{1/2}$大约为10^{-3}mol L^{-1}s。它是所检测的DNA中复性最快的。

小鼠基因组（见7.8）包含大约10^6个300个碱基对的重复序列，这样的DNA就称作高重复DNA。高重复DNA的结构简单，摩尔浓度相对较高，复性较快。而另一个极端的牛胸腺非重复DNA的$C_0t_{1/2}$很高，反应了其基因组高度复杂。以COT分析动物细胞的总DNA，发现高重复、中等重复和独特（非重复）序列的三步曲线。独特序列是编码蛋白产物的序列。高重复序列位于染色体的着丝粒区域，主要参与染色体与染色体的识别。中等重复序列目前还了解很少。病毒和细菌DNA的COT分析没有表现出多个步骤，它们的DNA内不包含高重复和中等重复序列。

7.8 DNA的大小、组构和拓扑学

DNA分子非常长。例如，细菌细胞内的DNA包含一条双螺旋分子，当DNA分子伸展后，大约是杆状细胞直径的1000倍。这个DNA分子携带了细胞的所有遗传信息，即基因组。

染色体指包含所有基因组的物理或组构单位。因此，大肠杆菌基因组只有一条染色体，由单个DNA分子组成。它的大小为2.5×10^9Da，大约含有4.6×10^6个碱基对。DNA分子的大小通常用千碱基对（kb，1000碱基对）表示。大肠杆菌染色体的大小为4639 kb，它另一个特征为闭合或“环状”结构，即它没有游离末端。

例7.17

基因组大小、染色体数目和DNA拓扑学在不同种类生物中有什么变化？

一些病毒、细菌和真核生物（细胞内含有核的生物）的上述信息总结如下。

生物体	基因组大小/kb	每个基因组的染色体数	DNA拓扑学
病毒			
猿病毒40（SV40）	5.1	1	环状
噬菌体 $\phi X174$	5.4	1	环状、单链
噬菌体λ	48.6	1	线性
细菌			
大肠杆菌	4 639	1	环状
真核生物			
酵母菌	13 500	17	线性
人	2 900 000	23	线性

注意在例7.17中，噬菌体$\Phi X174$是单链而非双链。这种情况下，基因组大小的kb是指同等的双链形式的的碱基对数目。从简单的病毒进化到真核生物，基因组的信息量可大量增加。病毒和细菌基因组的千碱基对数目可粗略地认为与基因数相等，每一个基因编码一个蛋白质产物。而真核生物的千碱基对数目与基因数目并不相等，因为真核生物的DNA内有不表达的碱基序列（见第17章）。病毒和细菌（原核生物）的DNA普遍为环状DNA。真核生物中，每一个染色体包含一条线性双螺旋DNA分子。

问题：非常长的DNA分子是怎样凝聚成更致密的染色体结构？

真核生物中的DNA不能游离存在，而是与大约等量的碱性蛋白（组蛋白）形成复合物。很长一段时间认为细菌DNA不会形成这种复合物。细菌中尽管没有组蛋白，但却有越来越多的证据表明细菌中含有似组蛋白蛋白质，它帮助DNA凝聚成致密的拟核形式。

组蛋白有五种类型，分别为H1、H2A、H2B、H3和H4。它们的相对分子质量很低（$M_r=11\ 000\sim23\ 000$），并含有较大比例的碱性氨基酸精氨酸和赖氨酸。每一种情况下，一条多肽链的氨基酸分布都与众不同，碱性氨基酸聚簇在其中一侧，另一侧相对疏水。此外，组蛋白含有许多修饰的氨基酸侧链，例如甲基精氨酸和乙酰赖氨酸。

核蛋白复合物称为染色质。染色质能从核中像纤维一样分离出。当纤维伸展后，置于电子显微镜下观察，可见纤维就好像“珠子穿在一条绳子上”。大多数组蛋白构成的所谓珠子被称为核小体。核小体由8个组蛋白被大约200个碱基对的DNA缠绕组成，其中8个组蛋白分别是各两个H2A、H2B、H3和H4。用核酸酶消化染色质（见下）将产生核粒子，核粒

子仍含有8个组蛋白但是DNA只有140个碱基对。其余的受消化作用的影响的DNA，作为两个核之间的连接体与组蛋白H1连接。X射线衍射实验已探明了核粒子的结构。图7－11显示了DNA和组蛋白八聚体的排列。为了使DNA进一步致密，核小体凝聚成高级结构。

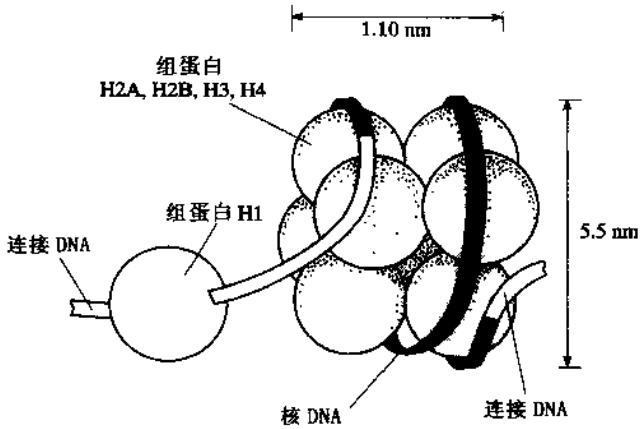


图7－11 核小体中组蛋白和DNA的排列

问题：什么是质粒？

质粒是细菌细胞经常含有的染色体外DNA分子，它们相对较小（最多200kb），以环状双链的形式存在。质粒可以独立于细菌染色体而自行复制，并且一个细胞内可以有多个拷贝。一个细胞内的质粒就像所有的DNA一样以负超螺旋构象存在。真核细胞也含有核外DNA，这种染色体外DNA存在于线粒体和叶绿体中。

问题：超螺旋DNA的含义是什么？

超螺旋代表DNA双螺旋的进一步缠绕，主要在环状DNA和通过与蛋白质的复合被拓扑限制的DNA中存在。如果环状DNA分子在松弛构象（非超螺旋）下两条链发生断裂，那么两条链在重新连接之前，一个或多个增加的右手螺旋圈将插入DNA分子，DNA分子因此自我缠绕形成正超螺旋。如果重新聚合前，螺旋是松弛的（左手方向），将导致负超螺旋。这两种形式是拓扑异构体，见图7－12。图中描述的每一种超螺旋只含单个超螺旋，DNA分子超螺旋的数目可以非常大。超螺旋DNA通过两条链中的一条上的相邻核苷酸之间的一个切口可转变为松弛型，这种形式不受拓扑学限制。

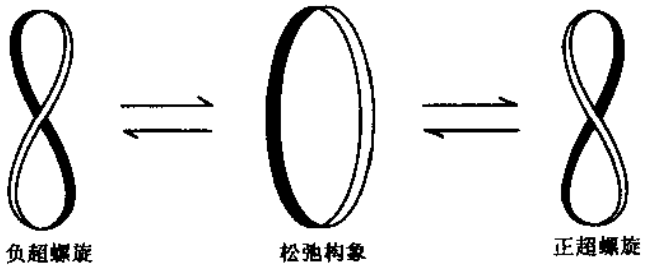


图7－12

7.9 RNA的结构和类型

RNA由含有腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶和胞嘧啶的多核糖核苷酸链组成。细胞的核中和细胞质中均有RNA。

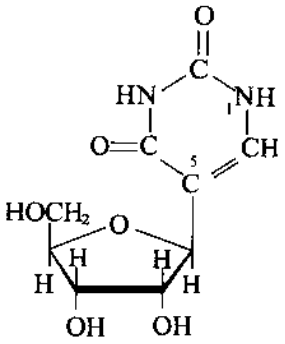
问题：化学组成上 RNA 和 DNA 的主要差别是什么？

ZRNA 有很多种形式，相对分子质量从 25 000 到几百万。多数 RNA 只含一条多核苷酸链，但它能够自我折叠形成含有 A:U 和 G:C 碱基对的双螺旋区域。

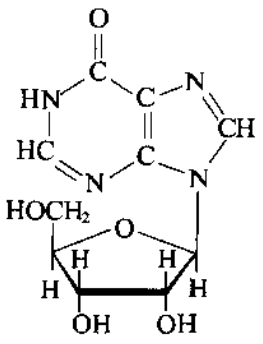
问题：一个典型细胞中 RNA 有什么类型，其作用分别是什么？

主要有三种类型，转移 RNA（tRNA）、核糖体 RNA（rRNA）和信使 RNA（mRNA），它们在遗传信息表达中的作用将在第 17 章详细讨论。

转移 RNA 的功能是多肽链合成的连接物。它占细胞总 RNA 的 10%～20%，每一种氨基酸至少有一种 tRNA。转移 RNA 是独特的，因为它含有相对高比例的罕见的核苷（如假尿苷、肌苷和 2′-*O*-甲基核苷）以及多种类型的修饰碱基（如甲基化或乙酰化的腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶）。作为例子，假尿苷和肌苷的结构显示如下。肌苷在密码子-反密码子配对中起重要作用。



假尿苷
（5-核糖尿苷）



肌苷

核糖体 RNA 存在于核糖体中，含有近似等量的蛋白质。核糖体 RNA 占细胞总 RNA 的 80%，超速离心时，根据沉降速率的不同可分为几种类型（第 4 章）。例如，细菌核糖体含有三种 RNA：5S、16S 和 23S。核糖体的结构和功能将在第 17 章详细讨论。

信使 RNA 是异源性很高的 RNA。每一个信使 RNA 分子携带一个 DNA 序列的拷贝，在细胞质中被翻译成一条或多条多肽链（第 17 章）。

7.10　核酸酶

核酸酶是通过切断磷酸二酯键降解核酸的酶。它们可以是对 DNA 或 RNA 特异性的，也可以非特异性地作用于 RNA 和 DNA。DNA 特异性核酸酶称为脱氧核糖核酸酶（DNase），而 RNA 特异性核酸酶为核糖核酸酶（RNase）。

例 7.18

核酸酶作用于多核苷酸链时，其所作用的键的位置是否具有特异性？

核酸酶有两种类型：（1）外切核酸酶和（2）内切核酸酶。外切核酸酶与多核苷酸链的末端（5′或 3′）结合，并且每次切去一个或几个核苷酸。一些外切核酸酶作用于 5′末端，并以 5′→3′方向水解核苷酸（5′→3′外切核酸酶）；另一些（3′→5′外切核酸酶）则从 3′端开始以相反方向进行降解。也存在一些外切核酸酶可作用于两个末端。外切核酸酶没有碱基或序列特异性。

内切核酸酶的作用不需要末端，而是催化切割多核苷酸链的一个或多个位点。许多内切核酸酶具有对多核苷酸链某些位点（特异碱基序列）的特异性。

问题：核酸酶是否可以既作用于单链核酸，又可作用于双链核酸？

尽管一些核酸酶可以水解单链和双链两种核酸，但许多外切和内切核酸酶在这点上还是有差异的。例如，DNase I（牛胰腺）和 DNase II（小牛胸腺）能够水解两种形式的核酸。但这两个酶的差别在于 DNase I 产生 5′-P-末端寡核苷酸而 DNase II 产生 3′-P 末端寡核苷酸。另一方面，内切核酸酶 III（大肠杆菌）是一种 3′→5′内切核酸酶，它需要双链 DNA 作为其底物。

问题：什么是限制性内切核酸酶？

限制性内切核酸酶是细菌中“DNA 免疫系统”的一部分。它们通过催化外源 DNA 双链的断裂，防止其进入并保护细胞；而细胞自身的 DNA 被保护。限制性内切核酸酶有三种类型。II 型限制性内切核酸酶对 DNA 分子的分析和形成非常有用，它们在特异性位点切割双链 DNA，这些位点由四个或八个核苷酸序列组成。这些被切割序列的一个重要特征是双重旋转对称。现已确定近 300 种 II 型限制性内切核酸酶的切割位点，许多情况下，切割是交错进行，从而产生重叠的 3′-羟基或 5′-磷酰基末端。常用的 *Eco*R I 内切核酸酶的切割位点和序列的识别如下所示，箭头代表每条链的切割位点。

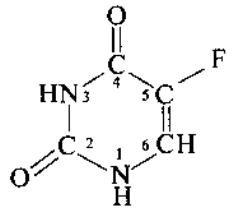
问题解答

核酸及其化学组成；核苷；核苷酸

7.1 写出 5-氟尿嘧啶的结构。

答：

尿嘧啶为2,4-二氧嘧啶，5-氟尿嘧啶是尿嘧啶的 C-5 上连接了一个氟原子。因此，它的结构是：



7.2 5-溴尿嘧啶是胸腺嘧啶的类似物，但 5-氟尿嘧啶不是，为什么？

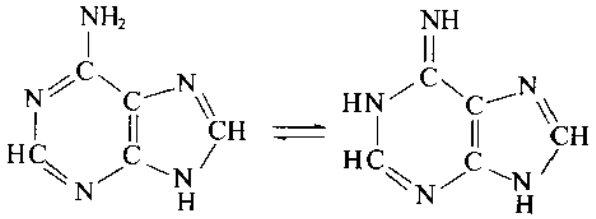
答：

胸腺嘧啶是 5-甲基尿嘧啶。氟原子比甲基小得多，但溴原子与甲基大小相似。通过 DNA 聚合酶的作用，5-溴尿嘧啶可掺入 DNA 分子，但 5-氟尿嘧啶却不能。

7.3 写出腺嘌呤的互变异构形式。

答：

腺嘌呤经历氨基⟷亚氨基互变异构体的变化。因此，

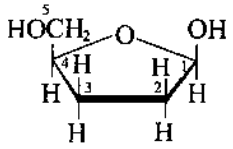


氨基形式　　亚氨基形式

7.4　写出2,3-双脱氧-β-D-核糖的结构。

答：

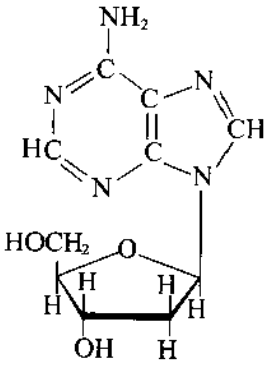
这个化合物是β-D-核糖，其中失去了C-2和C-3上的氧原子。因此，它的结构是：



7.5　如果DNA水解产生了2,3-双脱氧-α-D-核糖，那么这个糖将以什么样的端基异构形式存在？

答：

2,3-双脱氧-β-D-核糖和2,3-双脱氧-α-D-核糖均存在。因为前一种异构体在DNA结构内稳定，水解后转变为α形式。



7.6　写出脱氧腺苷酸的结构。

答：

脱氧腺苷酸为9-2′-双脱氧-β-D-呋喃核糖腺嘌呤，或2-脱氧-D-核糖的C-1与碱基的N-9以β-糖苷键相连。因此，它的结构为：

7.7　核苷及其组分腺苷、尿苷、D-核糖、脱氧鸟苷、胞苷和胸苷中的哪一个大量在RNA的部分水解液中存在？

答：

含有2-脱氧-D-核糖（只在DNA中发现）的脱氧鸟苷和含有胸腺嘧啶（只在DNA中大量存在）的胸苷将不存在。

7.8　将下列具有相同结构的化合物配对：鸟苷一磷酸、脱氧鸟苷酸、dGDP、GTP、脱氧鸟苷一磷酸、GMP、鸟苷三磷酸、dGMP、脱氧鸟苷二磷酸。

答：

鸟苷一磷酸 = GMP

脱氧鸟苷酸 = dGMP = 脱氧鸟苷一磷酸

dGDP = 脱氧鸟苷二磷酸

GTP = 鸟苷三磷酸

多核苷酸

7.9　含有20个核苷酸单位的线性多核苷酸内存在多少个3′，5′-磷酸二酯键？

答：

磷酸二酯键存在于两个相连的核苷酸之间，因此一条多核苷酸磷酸二酯键的总数比其核苷酸单位少一个。而链的5′或3′端的磷酸不形成磷酸二酯键。所以，答案为19。

7.10　写出四核苷酸ApGpUpCp的化学结构。

答：

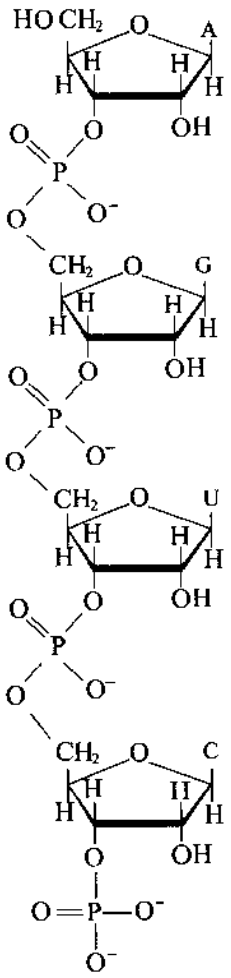
请记住多核苷酸的序列总是从左到右以5′→3′方向书写。因此3′端磷酸化。这个序列

的糖为D-核糖，因为没有d前缀。所以，它的结构如下所示。

7.11 中性pH时，ApGpUpC携带多少电荷?

答：

这个四核苷酸含有三个磷酸，每一个携带一个游离质子。分子的其他部分在中性pH不带电荷。因此，所携带的电荷为3。



7.12 自然界是否存在一个同时含有DNA和RNA的共价结构的多核苷酸?

答：

存在，但量很少并且是瞬间的。通过非连续DNA复制形成的新生（或冈崎）片段含有一段短的伸展的RNA，这段RNA是DNA链生长的引物（第16章）。

结构DNA

7.13 写出下列DNA序列的互补序列：GCTTAGTA

答：

DNA的互补碱基配对为G与C配对，A与T配对。因此答案为CGAATCAT。

7.14 写出问题7.13序列的RNA的互补序列。

答：

DNA和RNA配对时，DNA中的A和G分别与RNA中的U和C连接。因此答案是CGAAUCAU。

7.15 碱基配对时，5-甲基胞嘧啶与胞嘧啶一样。为什么?

答：

5-甲基胞嘧啶的甲基远离与鸟嘌呤形成的氢键，并且不会干扰G:C之间三个氢键的

形成。

7.16　为什么DNA纤维干燥后会缩短?

答:

高湿度下DNA双螺旋主要以B型存在,其螺距(或重复距离)为3.4nm,包括10个碱基对。而低湿度条件时,DNA由B型转变为A型,其螺距较小,为2.8nm,并包括11个碱基对。

7.17　将一个DNA纤维由高湿度转移到低湿度,即由B型转变为A型,它大约会缩短百分之多少?

答:

假设DNA双螺旋含有100个碱基对。如果为B型时,其长度为34nm(每10个碱基对3.4nm)。如果为A型时,它将减少到大约25.5nm(每11个碱基对2.8nm)。因此,DNA的长度将减少大约25%。

7.18　如果DNA双螺旋的一条链中A和G的组成(摩尔百分比)分别为:A=27,G=30。请问它的互补链的T和C的含量是多少?

答:

DNA双螺旋中,一条链的T和C(摩尔百分比)分别等于另一条链的A和G。因此,其互补链的T=27,C=30摩尔百分比。

7.19　问题7.18中DNA中的那条链,其互补链的A和G的含量为多少?

答:

从所提供的数据看,互补链A和G的含量不能确定。但是,互补链A+G的含量为100-(27+30),即43摩尔百分比。

DNA的变性

7.20　为什么环状双螺旋DNA比线性双螺旋DNA复性快?

答:

当变性时,环状DNA的两条单链仍保持连接(假设两条链均没有断裂),所以复性时,能够比线性DNA更快地找到另一条链。

7.21　为什么将DNA放入纯水即离子强度为0时会产生变性?

答:

DNA的解链(或变性)温度依赖于离子强度;随着离子强度的降低,解链温度降低。在离子强度为0的极端环境中,DNA的阴离子基团不被相反电荷的离子保护,其静电排斥足以使解链温度降低到20℃之下。

7.22　为什么病毒DNA比细菌DNA的序列不均一性低?

答:

病毒比细菌的基因组携带较少的基因。因此,在一特定量的DNA中,病毒基因将比各个细菌基因的拷贝数多。而不同的基因有不同的核苷酸序列,病毒DNA中各种序列出现重复的机会相对要多一些,也就是说,病毒DNA的不均一性较低。

DNA的大小、组构和拓扑学

7.23　大肠杆菌染色体大约为4000kb,其(B型)长度为多少?

答:

B型DNA每十个碱基对长3.4nm,或每千碱基对340nm。所以大肠杆菌染色体长为1.36×10^{6}nm,或大约1.4nm。

7.24　人体细胞(二倍体)中的B型DNA的长度为多少?

答:

人基因组的大小为 2.9×10^9kb，所以二倍体细胞含有 5.8×10^9kb。如为 B 型 DNA，则长度为 2×10^9nm 或 2m。

7.25 人体细胞核的直径为 10μm，它怎样容纳 2×10^6μm 的双螺旋 DNA?

答：

DNA 与组蛋白结合凝聚为染色质。凝聚的基本单位是核小体，而且这些重复结构（每个含 200 个碱基对的 DNA）能进一步组成更紧密的结构从而形成染色体。

7.26 DNA 结构的什么特征对超螺旋很重要?

答：

超螺旋是将 DNA 结构中增加的双螺旋扭曲引入（或除去）的结果。因此，超螺旋的 DNA 必须是双螺旋的，而且是拓扑学限制的。例如，DNA 环化或与蛋白质的复合，可通过在某一位点将两条链“系”在一起进行。

7.27 如果在某一位置将环状 DNA 分子的两条链分开（解旋），什么类型的超螺旋将被引入分子的其余部分?

答：

如果分子的双螺旋部分仍保留，DNA 将过旋。因此，额外右手回转将引入这部分 DNA，这将导致正超螺旋。

RNA 的结构和类型

7.28 RNA 和 DNA 的主要化学差异是什么?

答：

RNA 中的糖是核糖，而 DNA 为脱氧核糖。并且，尿嘧啶存在于 RNA，而 DNA 中是胸腺嘧啶。

7.29 一个典型细胞中 RNA 含量最多的类型是什么?

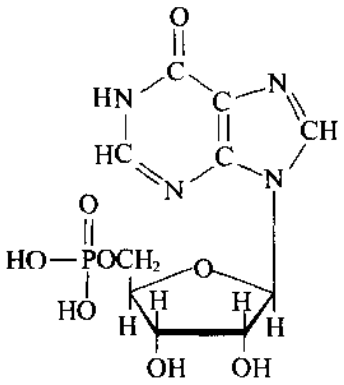
答：

核糖体 RNA（rRNA）大约占总 RNA 的 80%，所以是含量最丰富的。

7.30 写出肌苷 5′-磷酸（IMP）的结构。

答：

IMP 是肌苷的一个磷酸基团与核糖残基的 C－5 相连。因此，它的结构是



7.31 RNA 和 DNA 的解链曲线比较有何区别?

答：

DNA 几乎总是双螺旋。当加热通过解链温度时，在一个很窄的温度范围内，DNA 从自然（双螺旋）变为变性（无规卷曲）状态，这个过程伴随着 A_{260}（波长 260 的光吸收）百分之 40 的提高。而 RNA 几乎总为单链，它链内碱基对的程度一般很低并且可变。而且短的碱基对（或双螺旋）区域变化稳定。因此，提高典型 RNA 溶液的温

度将导致 A_{260} 逐渐提高，反应了短的螺旋区域的连续解链，A_{260} 的提高明显低于百分之 40。

核酸酶

7.32　核酸酶切断的是什么类型的键？

答：

核酸酶切断的为3′,5′-磷酸二酯键。核酸酶总是催化连接于糖的 C－3 或 C－5 的酯键的水解，产生 5′-或 3′-磷酸加 3′-或 5′-羟基。

7.33　为什么一个外切核酸酶不能降解噬菌体 ΦX174 的 DNA？

答：

外切核酸酶需要含有 5′或 3′端的 DNA 或 RNA 作为底物。而 ΦX174 的 DNA 是单链环状 DNA，没有 5′或 3′端。

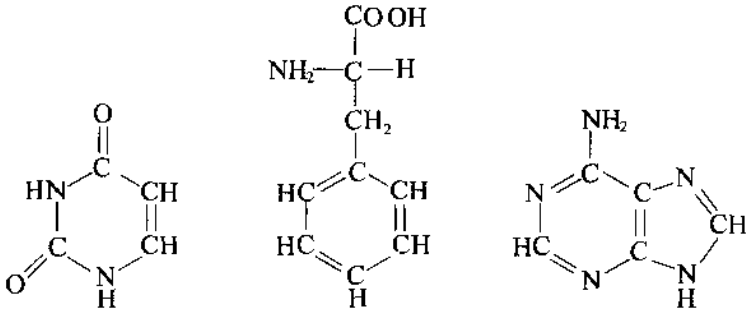
7.34　你认为大肠杆菌染色体上大约有多少个 EcoRI 位点？

答：

EcoRI 识别并切断 DNA 内含六个碱基对的特异序列。考虑到每一个位点都可能是四个正确配对的碱基对中的一对，所以每 4^6（或 4096）碱基对的随机序列就有一个 *Eco*RI 酶切位点。大肠杆菌染色体有 4.6×10^6 个碱基对，因此，染色体就将有大约 $4.6\times10^6/4096$ 或大约 1000 个 *Eco*RI 位点。

补充问题

7.35　下列哪个化合物为嘌呤或嘧啶？



(a)　(b)　(c)

7.36　列出（a）RNA 和（b）DNA 中共同存在的含氮碱基。

7.37　（a）写出 5－甲基胞嘧啶的结构。(b) 它是否为 DNA 的通常的组分？

7.38　写出胞嘧啶的亚氨基形式。

7.39　写出（a）脱氧胸苷和（b）胸腺嘧啶核糖核苷（一些 RNA 中的小组分）的结构。

7.40　举一个 *N*－糖苷的例子。

7.41　核苷和核苷酸的区别是什么？

7.42　写出3′,5′-AMP（环化 AMP）的结构。

7.43　下列化合物中的哪一个与其他化合物不同：(a) GMP、(b) 脱氧鸟苷一磷酸、(c) 鸟苷酸、(d) 鸟苷－5′-磷酸？

7.44　四核苷酸 d-ApGpUpCp 不是 DNA 部分水解形成的，为什么？

7.45　产气荚膜梭状芽孢杆菌与粪产碱杆菌的 DNA 相比，哪一个抗变性能力更强？

7.46　序列互补性的含义是什么？

7.47　列出 B 型和 Z 型 DNA 结构的三个主要差别。

7.48 为什么双螺旋结构的 DNA 在高离子强度的溶液中比低离子强度溶液更稳定?

7.49 为什么细菌 DNA 的非重复序列复性比真核 DNA 快?

7.50 序列复杂性的含义是什么?

7.51 染色体和基因组的区别是什么?

7.52 核心组蛋白和接头组蛋白的区别是什么?

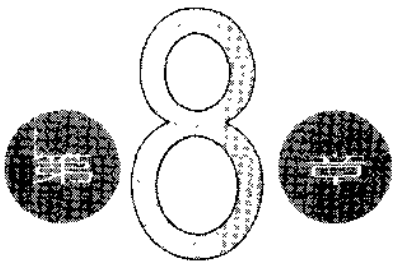
7.53 组蛋白的氨基酸组成的什么特征使之与 DNA 强烈地结合?

7.54 (a) DNA的正超螺旋和负超螺旋有什么区别? (b) 什么是超螺旋 DNA 的松弛? (c) 怎样得到松弛的超螺旋 DNA?

7.55 请列出 DNA 和 RNA 化学组成的主要差别。

7.56 为什么细胞的细胞质中信使 RNA (mRNA) 是主要的含有异源碱基序列的 RNA 形式?

7.57 下列哪一个序列不能被限制性内切核酸酶切断? 为什么? (a) GAATTC; (b) GTATAC; (c) GTAATC; (d) CAATTG。



酶的催化作用

8.1 基本概念

问题：什么是酶？

酶是催化生物化学反应的生物催化剂，在细胞中浓度很低。酶可以在不改变平衡位点的情况下提高反应速率，即通过相同的因子，可以同时提高正反应和逆反应的速率。这个因子通常可将反应速率提高 $10^3 \sim 10^{12}$。

例 8.1

尽管我们早已知道发酵和消化现象，但对于酶的第一次清楚的认识是由 Payen 和 Persoz（*Ann. Chim.*（*Phys*），53，73，1833）在研究麦胚提取液时发现的。他们发现麦胚提取液的酒精沉淀物中含有一种将淀粉转变为糖的不耐热物质。

例 8.2

上面提到的物质被称为淀粉酶（希腊语："分离"），因为它具有从淀粉谷粒的不可溶被膜中分离可溶性糊精的能力。之后淀粉酶成为这些酶混合物的一般应用名称，直到 1898 年，Duclaux 建议在酶的名称中使用-ase，这个分类方式一直沿用至今。

例 8.3

许多酶是从大量的原料中纯化而来。J. B. Sumner 第一次将从刀豆中分离的脲酶结晶，这项工作用了 6 年多时间（1924～1930）。J. B. Sumner 于 1946 年获得了诺贝尔奖。这项工作彻底地证明了酶的明确的化学本质。

例 8.4

二氧化碳气体能迅速地溶解于水并自动地水合形成碳酸，而碳酸又能迅速地分解为一个质子和一个碳酸氢根离子：

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

25℃，pH7.2 时，20mmol$L^{-1}$$CO_2$ 的正向水合反应速率为 0.6mmol$L^{-1}s^{-1}$。

在哺乳动物的红细胞中，碳酸酐酶的浓度为 1～2gL^{-1}细胞，它的相对分子质量为 30 000，因此，它的摩尔浓度为 50×10^{-6}。在上述条件并且酶在此浓度时，正反应的速率为 50mol$L^{-1}s^{-1}$，比非催化过程提高了 8×10^4。

有超过 2500 种不同的生化反应依靠特异性酶提高它们的反应速率。因为不同组织产生结构不同的变异酶，所以在生物学领域内的不同酶蛋白一共超过 10^6 种。每一种酶都具有作用于窄范围的化学相似底物（反应物）的专一性，并且酶活性可被其他分子调节，这些分子被称为效应物，它们可以是激活剂、抑制剂或同时即为激活剂又为抑制剂。对于许多复合酶，一种化合物也许具有两种效应，这主要依赖于其他的物理和化学条件。酶的大小可以从大的多亚基复合物（称为多聚体酶，M_r 约为 10^6）到小的单亚基形式而变化。

例 8.5

天冬氨酸氨甲酰转移酶是催化嘧啶生物合成的第一个关键反应，它催化氨甲酰磷酸和天

冬氨酸形成氨甲酰天冬氨酸（第 15 章）。大肠杆菌来源的这种酶由 12 个亚基组成，其中 6 个为调节亚基，其余 6 个为催化亚基。CTP 是一个负效应物，它通过结合到调节亚基上而抑制酶的作用。ATP 是正效应物，当琥珀酸在活性位点通过与天冬氨酸的直接竞争抑制了反应的进行时，ATP 通过调节亚基发挥作用（见第 9 章有关效应物的讨论）。

即使最小的酶（例如核糖核酸酶，M_r－12 000），它的表面也能被与反应物结合的化学基团所占据，所占据的面积不到总表面积的百分之 5，此区域被称为酶的活性位点。

问题：酶的哪一个部分负责它的底物专一性？

活性位点氨基酸侧链的特有排列决定了此位点所结合和反应的分子类型，酶中一般大约有五个这样的氨基酸侧链。此外，许多酶有结合在或靠近于活性位点的小的非蛋白质分子，这些非蛋白质分子决定了底物的专一性。这些分子如果没有与蛋白质共价结合，就称为辅因子；如果与蛋白质共价结合则称为辅基。有一些酶的活性还需要特异的金属离子。

例 8.6

碳酸酐酶的每一个分子都含有一个 Zn^{2+}，并且这个金属离子位于活性位点。天冬氨酸氨甲酰转移酶每十二个亚基（dodecamer）有六个 Zn^{2+}，它们的主要作用是稳定复合物，因为没有 Zn^{2+} 的六聚体将解离。

8.2　酶的分类

问题：酶命名的根据是什么？

所有酶均按照国际理论和应用化学联合会（IUPAC）的酶学委员会制定的分类系统命名，是在酶所催化反应类型的基础上而命名。每一种酶都有一个特别的四位整数的 EC 编号和一个复杂但明确的名称，避免出现酶催化相似但不相同反应的混乱。事实上，许多酶共用一个名称，这个名称来源于它所催化的主要的特异性反应物后加后缀-ase。一些共用名称甚至没有-ase 后缀，它们在酶系统分类之前就已被研究和命名。

例 8.7

一个标准的酶的名称比如精氨酸酶和脲酶，它们分别作用于精氨酸和尿素（第 15 章）。两个非标准的酶名称如胃蛋白酶，它是一个消化道蛋白水解酶（EC 编号为 3.4.23.1）以及硫氰酸生成酶（硫代硫酸盐：氰化物硫代转移酶，EC2.8.1.1），它存在于哺乳动物的肝脏和肾脏中，催化清除体内氰化物和硫代硫酸盐的反应。后一种情况的酶就是在酶的系统分类之前命名的，因此可以理解为什么旧名称仍在通用。

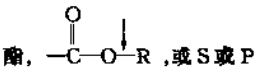
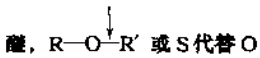
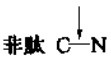
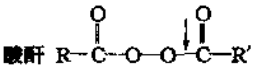
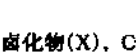
EC 编号的第一个数字表示一个酶属于六个大类中的哪一类（表 8.1）。

表 8.1　酶的主要分类

EC 编号的第一个数字	酶的分类	催化反应的类型
1	氧化还原酶类	氧化还原反应，其中一个底物为氢或电子供体
2	转移酶类	化学基团一般形式的转移，A－X＋B→A＋B－X
3	水解酶类	C—C、C—N、C—O 及其他键的水解反应
4	裂合酶类	C—C、C—N、C—O 及不包括双键在内的其他键的裂解（不是水解）
5	异构酶类	分子的几何学（立体）重排变化
6	连接酶类	两个分子的连接反应（合成），伴随一个化合物的水解，且其 ΔG 较大

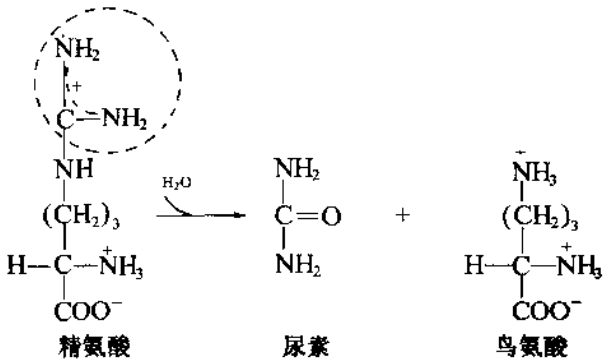
第二个数字表示该酶属于哪一个亚类，如果是水解酶，第二个数字则表示酶所作用的键的类型（表 8.2）。

表 8.2　水解酶的亚分类

EC 编号的前两个数字	所作用的键的类型
3.1	酯，  ，或 S 或 P 代替 C，或
3.2	糖基、糖 ，或 N 或 S 代替 O
3.3	醚，  或 S 代替 O
3.4	
3.5	非肽 
3.6	酸酐 
3.7	
3.8	卤化物(X)，  或 P 代替 C
3.9	
3.10	
3.11	

例 8.8

精氨酸酶是产尿素生物体（尿素代谢）肝脏中的水解酶。它催化反应：



精氨酸　　尿素　　鸟氨酸

这个酶的标准 EC 名称为 L-精氨酸-脒基水解酶，它催化在 C—N 之间加入水分子而导致脒基（方程式中的圈内部分）从精氨酸上裂解下来的反应。在这个反应中，它断裂了一个非肽键 C—N，所以，精氨酸酶的第二个 EC 编号的数字为 5，其完整 EC 编号为 3.5.3.1。

第三个数字是所作用键的类型或反应中基团转移的亚分类，或兼顾二者的亚分类，EC

分类是从一个主要的 EC 种类到下一个变化。第四个数字是简单的序列号。

8.3　提高键断裂速率的方式

酶提高化学反应速率的基本机制可分为四种类型。

邻近易化

也称为邻近效应，它指当两个分子从稀释溶液中分离并在酶的活性位点相互靠近时，两个分子反应速率的提高。这个效应主要是提高了反应物的有效浓度。

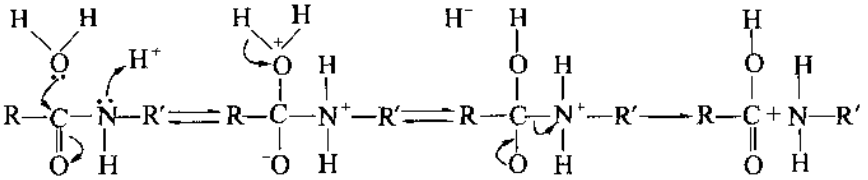
共价催化

氨基酸侧链通常表现为催化的亲核基团，包括 $RCOO^-$、$R—NH_2$、组氨酰基、R^-O^-、RS^-。这些基团攻击底物的亲电性（缺乏电子）部分使底物和酶之间形成共价键，因此，产生了一个反应中间体。这个过程在基团转运的酶中特别明显（EC 分类为 2，见表 8.1）。在共价结合的中间体的形成过程中，通过酶攻击底物的亲核物质（例 8.10 中的酶 X）能够导致亲核物质的酰化作用、磷酸化作用或糖基化作用。

写出某反应的化学机制，此机制说明底物通过某种过渡态转变为产物时，发生了电子重排。常用的描述键的电子重排的方法是通过弯箭头表示电子流动的方向。

例 8.9

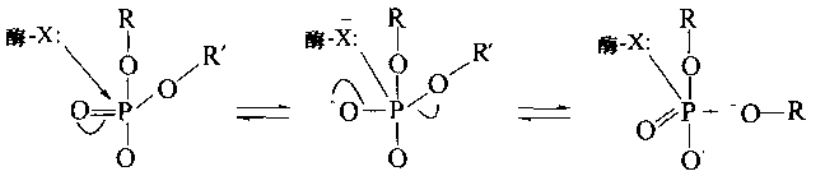
一个肽键水解时的电子流向图如下所示：



由于电子离开羰基氧而使羰基碳缺乏电子，这样的亲电性羰基氧就受到亲核性水的攻击。注意第二和第三个结构中的四面体中间体，在这两个结构中，碳原子通常以含四个键的四面体排列。

例 8.10

在共价催化过程中，有一种类型的酶可形成磷酸酶中间体：



在 EC 分类 2 的酶中发现酶共价催化的大量例子，其中之一为己糖激酶。

第二个亲核物质攻击共价中间体可导致产物的释放。当第二种亲核物质为水时，整个反应称为水解。在许多情况下，亲核物质并非简单的酶的氨基酸侧链，而是辅基，转移酶中的吡哆醛磷酸就是其中一例（第 15 章）。

一般的酸碱催化

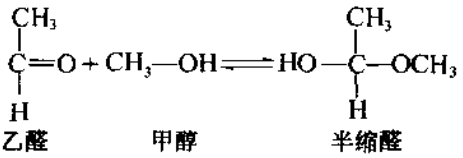
酸碱催化是过渡态中质子转移的过程。本质上，它不参与共价键的形成，但它参与整个酶反应。

例 8.11

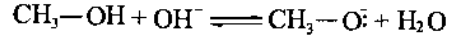
一个来源于有机化学的一般酸碱催化的例子说明了上述内容，但注意在某些酶反应中也

有半缩醛的形成。

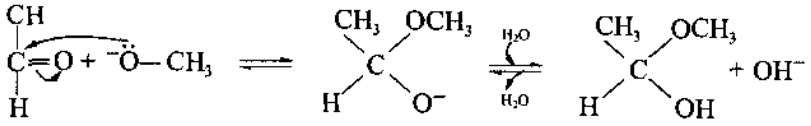
总反应：



反应机制 A：碱（OH^-）加速了半缩醛的形成，如下所示：



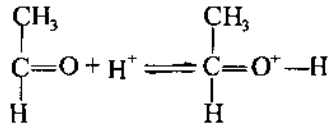
亲核物质



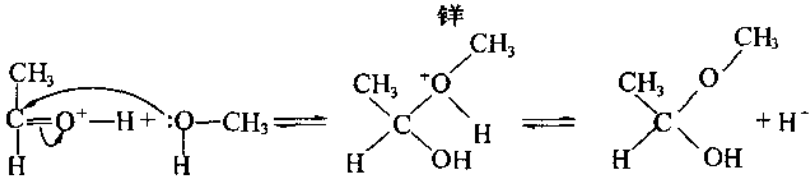
亲核性攻击

注：OH^- 在反应中被循环利用，因此，它可认为是实际意义上的催化剂。

反应机制 B：反应中也存在酸催化剂，随着与醇的反应，它参与了钾盐的形成。



鎓



前一个例子中，在强酸和强碱的作用下，半缩醛形成的速率提高。在另外一些情况下，催化剂只有一种，非碱即酸。

例 8.12

硝酰胺的水解更易受碱催化剂而不是酸催化剂的影响。没有碱的净消耗下，pH 的提高将使反应速率提高，如下面反应所示：

$$NH_2NO_2 + OH^- \longrightarrow H_2O + NHNO_2^-$$

$$NHNO_2^- \longrightarrow N_2O + OH^-$$

OH^- 不是惟一催化水解反应的碱，其他碱如醋酸盐同样可以催化水解反应。例如：

$$NH_2NO_2 + CH_3COO^- \longrightarrow CH_3COOH + NHNO_2^-$$

$$NHNO_2^- \longrightarrow N_2O + OH^-$$

$$OH^- + CH_3COOH \longrightarrow H_2O + CH_3COO^-$$

按照 Brϕnsted-Lowry 的定义及前面的例子，酸是能够为其他物质提供质子的物质，而碱是可以接受质子的物质。

酸碱催化并不能使反应速率提高 100 倍以上，但与酶活性位点的其他机制共同作用能使酶反应速率极大地提高。谷氨酸、组氨酸、天冬氨酸、赖氨酸和半胱氨酸的氨基酸侧链如为质子化形式，就可作为酸催化剂，如为非质子化形式则可作为碱催化剂（见问题 8.11）。因此，一个侧链作为催化剂的有效性依赖于其 pK_a（第 3 章），而 pK_a 与活性位点所处环境以及酶作用的 pH 有关。

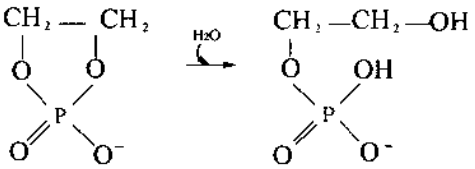
张力、分子扭曲和形状变化

张力存在于反应物的键系统内，当过渡态转变为产物（好像切断了一个绷紧的时钟弹

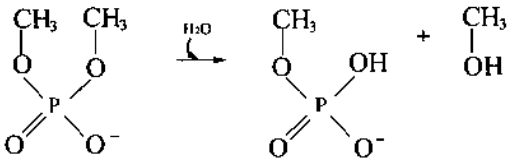
簧）时，张力的释放能使化学反应速率提高。

例 8.13

下面两个化学反应与一个磷酸酯键的水解相关。



(a)



(b)

在标准条件下，反应（a）比反应（b）快 10^8 倍。其原因为（a）中的环化化合物有相当大的键张力（这种构象的势能很高），当水解时张力随开环而释放。这种类型的张力在（b）中的二酯化合物内不存在。

在酶催化的情况下，不仅底物被扭曲（有张力），而且还有额外的自由度的引入，即酶及其全部的氨基酸侧链。酶与底物的结合涉及到相互作用的能量；该能量可促进催化反应。当催化速率提高时，一定存在着酶－底物复合物的整体去稳定作用以及过渡态稳定性的提高。图 8－1 说明了上述概念。

在非催化反应［图 8－1（a）］中，假设紧张构象对于两个反应基团之间的相互作用很必要，由于反应物不是紧张构象，所以将处于反应概率较低的状态。为了使反应发生，分子必须通过所谓的活化能障碍。在催化反应［图 8－1（b）］中，反应物与酶的结合形成一个复合结构（酶-底物复合物），这个结构使底物形成过渡态的可能性更大，也就是说，较少的能量就使反应基团聚在一起。因此，反应进行较快。

酶-底物复合物的去稳定作用可以想象是将以前较稳定构象的键角和长度进行扭曲。这点可通过底物和酶上基团的静电吸引和排斥获得。或者，可通过疏水活性位点上带电基团的去溶剂作用（除去水）获得。去稳定作用的一个进一步的原因是反应中的熵的变化，将在下一部分讨论。

问题：是否酶及其底物之间紧密的结合就意味着快速催化作用？

如果一个底物与酶连接时，结合能没有有效地转变为扭曲张力，那么这种结合将很强，但并不必然影响 $\Delta G^{\ddagger}$（图 8－1）。但是如果一些结合的自由能将底物扭曲转变为过渡态的形状，或将酶扭曲成为底物过渡态的互补形状，那么酶与底物的结合将减弱，而酶与过渡态底物的结合将提高。所以，酶与底物的紧密结合并不必然提高酶反应的速率。

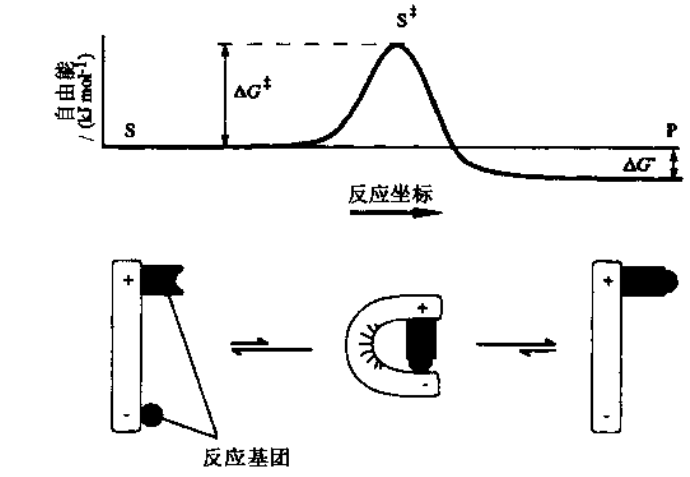
例 8.14

假设当酶浓度为 10^{-7}molL^{-1}（即 $K_d = 10^{-7}\text{molL}^{-1}$）时，底物半饱和于酶溶液的活性位点，但在生理条件下，该浓度变为 10^{-3}molL^{-1}。

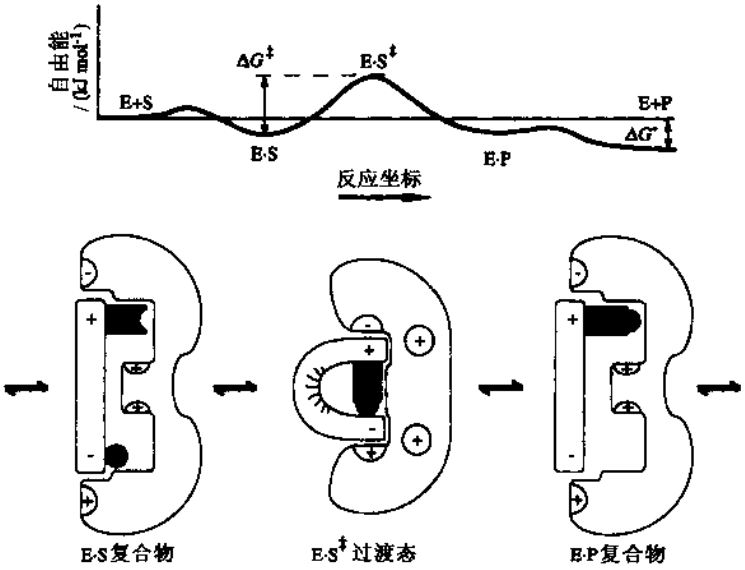
在生理条件下，酶的位点全部饱和（即所有位点均占满）。所以，如果大部分结合能用于酶－底物（E·S）复合物的去稳定作用，那么酶速率的提高并没有预期的大。

如果一些结合能用于酶和底物分子的张力导入和扭曲，那么酶与底物过渡态的结合将更

紧密，因此酶对于底物的结合亲和力将降低。



(a) 非催化反应



(b) 催化反应

图 8－1　活化能在催化反应中降低。每个反应模式上面的图表明反应的每一个阶段底物的能量（这里指弯曲底物的势能）变化。箭头及其长度表示反应的能力和速率。$\Delta G^{\ddagger}$表示过渡态分子的活化能，ΔG^{0} 表示反应的全部自由能（第 10 章）。酶和底物的变化使它们在过渡态比 E·S 或 E·P 态结合更紧密

事实上，许多酶具有与它们底物的亲和力，这在平均生理浓度下很有价值。这也可能是高效催化作用的进化压力的结果。

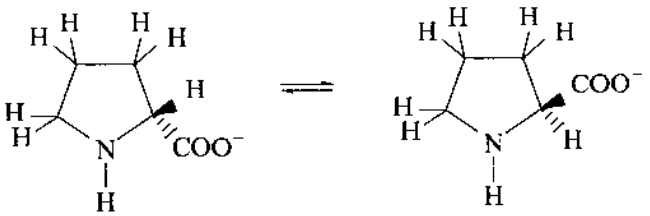
例 8.15

羧肽酶与假冒底物（一个不能被酶降解的错误底物，即一种抑制剂）结合的晶体的 X 射线分析表明，易受影响的肽键常常扭曲为不在正常平面的构象，这种构象经常在肽键中见到（第 4 章）。这种扭曲导致键中可以提高水解攻击敏感性的共振能丢失。

在催化过程中，酶底物复合物是不稳定的，并且所释放的能量用于形成过渡态；在过渡态中，酶与底物紧密结合。某些酶可被过渡态类似物所抑制。通常过渡态存在的时间非常短（$<10^{-13}$s），但其类似物是稳定的结构（与过渡态复合物相似）。

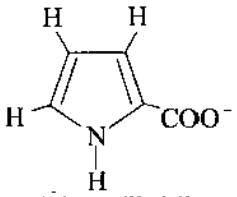
例 8.16

脯氨酸消旋酶是一种细菌酶，它催化脯氨酸 D 型和 L 型异构体的相互转变：



L-脯氨酸　　D-脯氨酸

假定在 L 型变为 D 型的过程中，一个分子的平面（而不是通常的四面体）构象将暂时以 α-碳原子形式存在。



吡咯-2-羧酸盐

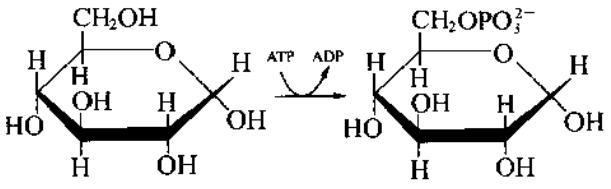
脯氨酸的一个平面类似物是吡咯-2-羧酸盐，它被证明是消旋酶的有效抑制剂。在低于 D 型或 L 型脯氨酸与酶百分之 50 结合的浓度的 160 倍的某一浓度下，它引起反应百分之 50 的抑制。因此，它是过渡态类似物的极好例子。

问题：酶和底物在反应时均有变化吗？

是。一个活性位点对底物的诱导契合概念强调了活性位点契合进底物功能基团的适应作用。一个不良的底物或抑制剂不能诱导在活性位点中的正确构象反应。

例 8.17

己糖激酶说明了诱导契合现象，它催化磷酸从 ATP 转移到葡萄糖的C-6，如下所示：



葡萄糖　　葡萄糖-6-磷酸

这个酶也催化将 ATP 的末端磷酸转移到水，即它的作用与 ATPase 相似，但其速率比上述反应慢 5×10^6 倍。水和葡萄糖的 C-6 羟基非常相似，从这点看，反应速率应没有差异。那么反应速率的差异主要在于葡萄糖引起的构象变化建立了酶中正确几何学的活性位点，而水分子太小，不能建立这样的活性位点。

含有结合能的良好底物能够诱导一个酶活性位点的恰当几何学形式。另外一个解释是诱导契合是一些小分子（如 H_2O 在己糖激酶中的例子）的无效结合，也就是说，因为它们小，所以有很多与其他底物（ATP 在己糖激酶中的情况）定位的可能，这样就不会发生反应。大底物在运动时受到限制，在分子振动过程中以正确催化方向存在的机率比在水中高上百万倍。

8.4 速率提高和活化能

问题：一些生化试剂当以纯品形式放置在架子上时很稳定，但当有酶的存在时，将很快降解。为什么？

一个底物的热力学稳定性（以反应的平衡常数表示）和动力学稳定性之间有一个重要的区别，后者仅指反应进行得有多快，但对平衡时底物和产物的相对量而言，前者指反应的最终位置（见例 8.18）。酶影响了底物的动力学稳定性。

例 8.18

许多还原性有机分子在氧化性的大气中是热力学不稳定的，如葡萄糖。

$$\text{葡萄糖} + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O \quad -\Delta G^0 = 2.872\ \text{kJ mol}^{-1}$$

因此，氧化作用是高度放能（产热的）的反应，并且反应能够获得大的 $-\Delta G^0$（第 10 章）。但我们知道葡萄糖在架子上是稳定的。因此，它热力学不稳定但动力学稳定。

热力学和动力学稳定性的区别非常重要，它们的区别可以通过活化自由能的概念解释，活化自由能对于将底物转变为过渡态很必要。为了使底物形成产物，它的内在自由能必须超过某一个值，即它必须克服能量障碍。能量障碍就是过渡态的自由能 $\Delta G^{\ddagger}$。由 H. Eyring 介绍的反应速率的过渡态理论认为反应速率与 $\Delta G^{\ddagger}$ 的大小相关。

问题：反应速率和 $\Delta G^{\ddagger}$ 有简单的数学关系吗？

有。在 19 世纪 80 年代，Arrhenius 观察到一个简单化学反应的速率常数随着温度而变化，其变化按照下式进行：

$$k = Ae^{-E_a/RT} \tag{8.1}$$

其中 E_a 被称为反应的 Arrhenius 活化能，A 为指数前因子，R 为常用的气体常数，T 为温度（K）。但是，很显然，A 不完全依赖于温度，特别是在催化反应中。因此，Eyring 提出了所有的过渡态以相同的速率常数 $\kappa T/h$ 分裂，κ 和 h 分别为 Boltzmann 和 Planck 常数。他因此提出了对所有反应的方程式，

$$k = \frac{\kappa T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \tag{8.2}$$

其中 $\Delta G^{\ddagger}$ 为过渡态复合物的活化能。

在第 10 章中将看到 Gibbs 自由能由两个组分构成，

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{8.3}$$

ΔS 为反应体系中熵的变化，ΔH 为焓的变化。因此，方程式（8.2）可被写为

$$k = \left(\frac{\kappa T}{h} e^{-\Delta S^{\ddagger}/R}\right) e^{-\Delta H^{\ddagger}/RT} \tag{8.4}$$

熵为一个平衡热力学实体，它可机械地解释为一个系统内的无序度。从方程式（8.4）可看出①当过渡态复合物形成时，指数前因子 A［方程式（8.1）］与结合于酶上的反应物的结构有关。②指数因子与反应的焓（热）有关。

任何可以稳定过渡态的分子因子都能够降低 $\Delta G^{\ddagger}$ 和提高反应速率。因此，熵或焓或二者共同导致了这个速率的提高。

8.5 定点诱变

通过对大量不同来源的酶（如：各种同工酶，或源自不同物种的酶）的比较研究对酶反

应机制已有了一定的了解。但这些来源中可供研究的变异数量通常有限。通过对特异性化学修饰酶的活性研究发现酶活性可被进一步修饰。随着克隆和表达 DNA 方法的成熟，通过定点诱变，特异性修饰酶的方法得以发展。例如，基因改变能产生序列特异性变化的蛋白质。诱变酶之间和诱变酶与野生型（或自然存在形式）之间的比较研究使我们获得了有价值的信息。在底物结合、催化、酶稳定和调节过程中特殊氨基酸残基所起的作用。

例 8.19

胰蛋白酶专一性地作用于与赖氨酸和精氨酸相邻的肽键，但酶活性位点的甘氨酸残基被丙氨酸（比甘氨酸多携带一个额外甲基）代替后，其专一性将改变。这个替代的丙氨酸与赖氨酸相结合，而不是稍大的精氨酸。

例 8.20

在枯草杆菌丝氨酸蛋白酶的催化机制中，四面体中间体通过一个氢键结合到 Asn155 的侧链上而稳定，以 Gly 代替 Asn155，底物结合不受影响，但会抑制催化步骤，这证实了上面所提出的机制。

例 8.21

在化学修饰研究的基础上，有人提出羧肽酶 A 的 Tyr198 是催化机制中的质子供体（即一个普通的酸）。然而，通过定点诱变的方法以 Phe 代替 Tyr198，修饰酶仍保留其酶活性，表明酪氨酰羟基在催化中也许没有特殊作用。

问题：特异的突变作用导致的活性消失是否表明突变残基具有催化作用？

不一定！一个氨基酸被另一个氨基酸代替可能消除对局部折叠甚至整个蛋白质稳定性非常关键的特异性相互作用。诱变后监测蛋白质构象在这些类型的研究中非常重要。如果以 X 射线晶体学或 NMR（第 4 章）获得酶的野生型和突变型的精细结构将会对研究更有帮助。

问题解答

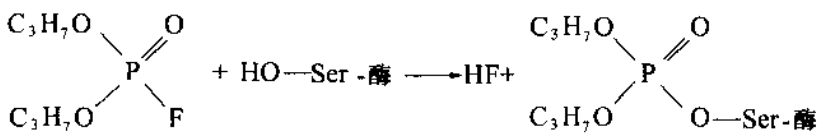
基本概念

8.1 证明：酶活性位点的表面积不超过其总表面积的百分之五。假设一个球形酶的分子质量为 27 000Da，其活性位点上有五个氨基酸。

答：

酶活性位点与整个蛋白质分子的体积之比为 5∶27 000/110＝0.02，因为氨基酸残基平均重 110。如果假设酶为球状，上述体积比就对应于表面积之比 $(0.02)^{2/3}\times 0.5$。因子 0.5 是由于活性位点的氨基酸残基有一半面向外表面，而另一半则面向酶的内部。所以答案为 0.04，或表面积的百分之四。

8.2 神经毒气二异丙基氟磷酸（DFP）在一些酶中与丝氨酸的—OH 反应生成 HF 和磷酰酯，如下所示：



1949 年 E. F. Jansen 和同事们所作的化学酶修饰实验中，胰凝乳蛋白酶首先在^{32}P标记的 DFP 中温育，然后用强酸将其水解。最后分离得到的氨基酸组分中每25 000 g 胰凝乳蛋白酶有 1mol 标记的 *O* -磷脂酰。从上述实验我们可以得到有关活性位点的氨基酸组成的什么信息?

答：

因为胰凝乳蛋白酶 $M_r = 25\ 000$，所以它的 27 个丝氨酸残基中仅有一个发生反应，表明其中一个特殊的丝氨酸是活性位点的重要组分。这个实验是许多酶修饰过程的原型，现在经常用于确定活性位点的组分。

酶的分类

8.3　六类 EC 编号的酶中含量顺序是什么?

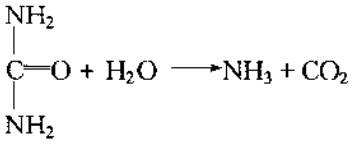
答：

在 2 500 种名称不同的酶中，最丰富的的是氧化还原酶，即第 1 类。其顺序为 1>2>4>3>6>5。

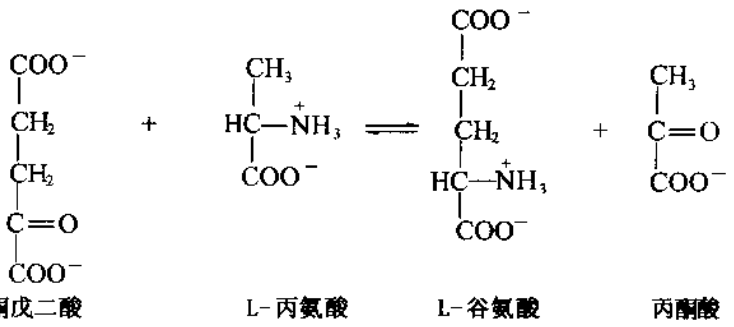
8.4　将下列酶促反应按照主要的 EC 编号分类，并提出每一个酶的常用名。

(a) D -甘油醛- 3 -磷酸 + Pi + NAD^+ →1, 3 -二磷酸甘油酸 + NADH

(b)

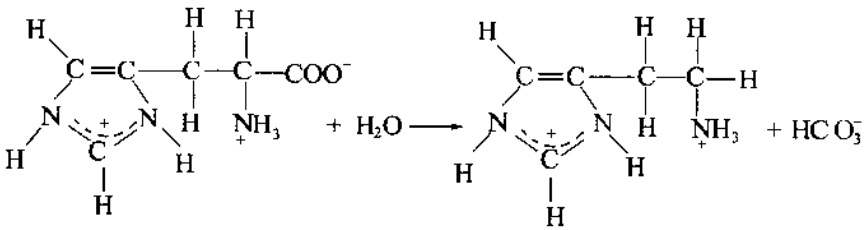


(c)



2-酮戊二酸　　L-丙氨酸　　L-谷氨酸　　丙酮酸

(d)



L-组氨酸　　组胺

(e) L -丙氨酸⇌D -丙氨酸

(f) L - 核酮糖- 5 -磷酸→D -木酮糖- 5 -磷酸

(g) 催化蛋白质中 S—S 重排的酶。

(h) ATP + L -酪氨酸 + $tRNA^{Tyr}$→AMP + PPi + L -酪氨酰- $tRNA^{Tyr}$

(i) ATP + γ - L -谷氨酰- L -半胱氨酸 + 甘氨酸↔ADP + Pi + 谷胱甘肽

答：

(a) 甘油醛- 3 -磷酸脱氢酶，EC 1.2.1.12。系统名称为 D -甘油醛- 3 -磷酸：NAD^+ 氧化还原酶（磷酸化）；它是一个重要的糖酵解酶。

(b) 脲酶，EC 3.5.1.5。它的系统名称为尿素酰胺水解酶。有趣的是它是一个含镍的

酶。

(c) 丙氨酸转移酶，EC 2.6.1.12。系统名称为 L-丙氨酸：2-酮戊二酸氨基转移酶。注意几乎所有氨基转移酶的辅因子均为吡哆醛磷酸。

(d) 组氨酸脱羧酶，EC 4.1.1.22。系统名称为 L-组氨酸羧基-裂合酶，在动物体内它同样需要吡哆醛磷酸，但细菌酶不需要。

(e) 丙氨酸消旋酶，EC 5.1.1.1。系统名称也为丙氨酸消旋酶。它很荣幸是第五类中的第一个酶。它同样需要吡哆醛磷酸作为辅因子。(外消旋混合物是一种化合物的旋光异构体的混合物，第 2 章)。

(f) 核酮糖磷酸差向异构酶，EC 5.1.3.4。系统名称为 L-核酮糖-5-磷酸-4-差向异构酶。它是一个戊糖磷酸途径中的关键酶。(差向异构体是一个糖分子仅在一个碳原子的构象上不同的立体异构体，第 2 章)。

(g) 二硫键（S—S）重排酶，EC 5.3.4.1。系统名称为蛋白质二硫键异构酶。其常用名是以反应后现象命名的例子，以反应后现象分类的酶称为现象酶，但 IUPAC 的 EC 编号和国际生物化学和分子生物学命名委员会（IUBMB）并不赞成这样命名。另一个常用的例子就是将移位酶用于酶或蛋白质载体的命名，它们催化某一基团在生物结构区室之间的移动，例如线粒体中的 ATP 移位酶（第 4 章）。

(h) 酪氨酰-tRNA 合成酶，EC 6.1.1.1。系统名称为 L-酪氨酸：$tRNA^{Tyr}$连接酶(形成 AMP)。它是第六类酶中的第一个，但更为重要的是它对生命的重要性，因为它作用于蛋白质的合成（第 7 章）。

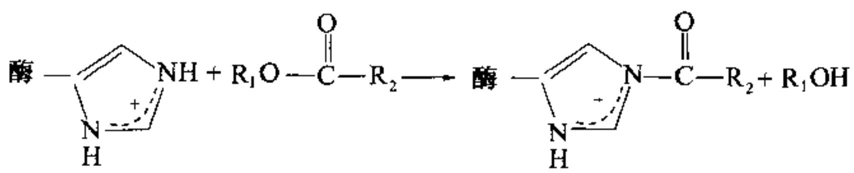
(i) 谷胱甘肽合成酶，EC 6.3.2.3。系统名称为 γ-L-谷氨酰-L-半胱氨酸：甘氨酸连接酶（形成 ADP）。它是谷胱甘肽生成的关键酶，在许多组织和生物中都发现它的存在。

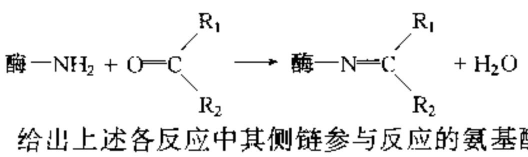
提高键断裂速率的方式

8.5　共价酶的催化作用主要是参与了酶及其底物之间短暂的共价键的形成。以下是经常遇到的酰基酶中间体和其他共价衍生物的一般结构。

1. $酶—OG + R_1O—C(=O)—R_2 \longrightarrow 酶—O—C(=O)—R_2 + R_1OH$

2. $酶—SH + R_1O—C(=O)—R_2 \longrightarrow 酶—S—C(=O)—R_2 + R_1OH$

3.


4.


(a) 给出上述各反应中其侧链参与反应的氨基酸残基。

(b) 写出酰基酶中间体化合物的化学名称。

答：

(a) (1) 丝氨酸 (2) 半胱氨酸 (2) 组氨酸 (4) 赖氨酸。

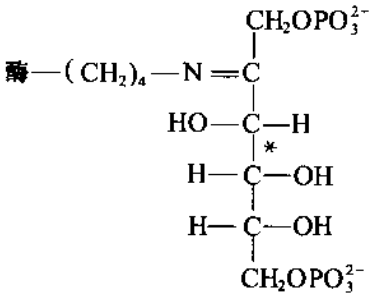
(b) (1) 酯 (2) 硫酯 (3) 酰基咪唑 (4) 希夫碱。

8.6　糖酵解途径的果糖 1,6-二磷酸醛缩酶与其酮底物果糖1,6-二磷酸形成一个酰基酶中

间体。酶中含有一个赖氨酸残基对其活性非常重要，请问所形成是什么类型的共价中间体？

答：

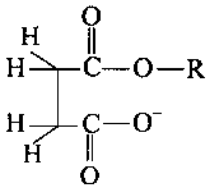
其结构为问题 8.5 (b) 中的 (4)，其名称为希夫碱（或酮亚胺）。



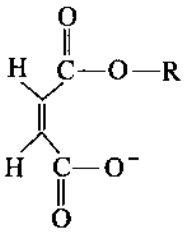
酮亚胺的形成活化了以星号标记的键，并导致其断裂。

8.7　近接效应对反应速率提高非常重要。在下列化合物的情况下，酸酐（除去水后的产物）以不同速率形成。请按照酸酐形成速率重排下列化合物的顺序并解释这个顺序的原因。

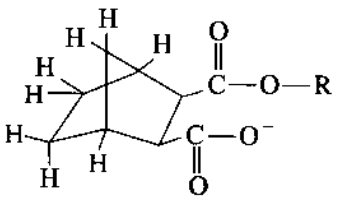
(a)



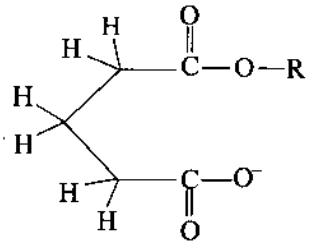
(b)



(c)



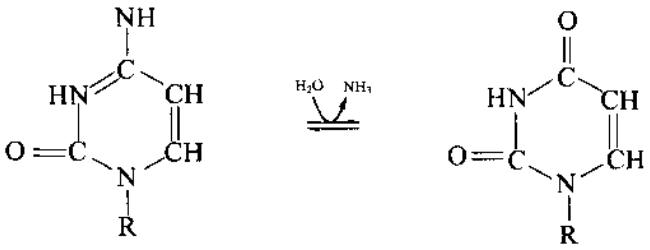
(d)



答：

酸酐形成的相对速率为：(d) 1；(a) 230；(b) 10 100；(c) 53 000。一个更大速率的提高通常发生在反应羧基被更快占据的化合物中，这缩短了过渡态形成的时间，因而缩短了产物形成的时间。

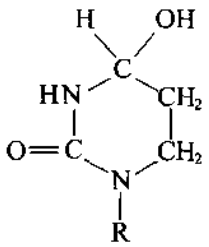
8.8　过渡态类似物是酶的有效抑制剂。在大肠杆菌来源的胞苷脱氨酶中，发生了下列化学变化：



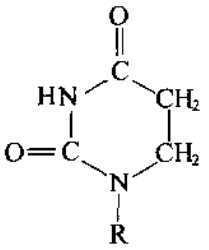
其中 R 代表一个核糖残基。

(a) 写出一个可能过渡态化合物的结构。

(b) 下面两个化合物有不同的反应速率，一个为过渡态类似物，另一个为底物。请问哪一个为类似物。



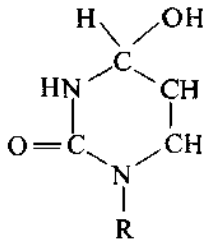
3,4,5,6-四氢尿苷
(1)



5,6-二氢尿苷
(2)

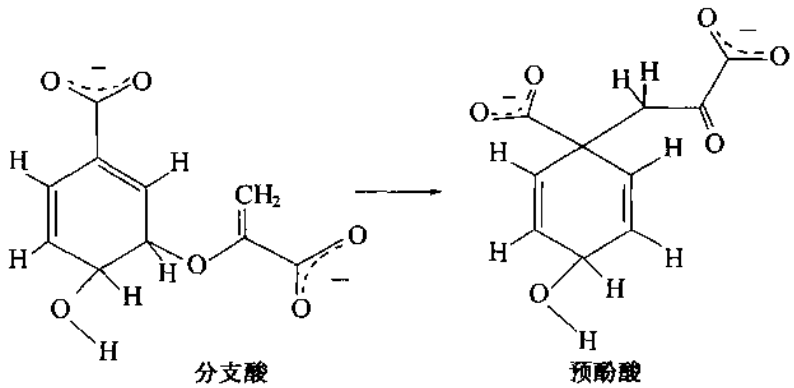
答：

(a) 可能的过渡态为四面体中间体，即一种化合物中有一个碳原子为四键排列的中间体：



(b) 化合物 (1) 与中间体的结构非常相似，它也确实为胞苷脱氨酶的有效抑制剂（过渡态类似物）。

8.9 细菌来源的分支酸变位酶-预酚酸脱氢酶很特别，它是一个蛋白质单位却有两种催化活性。它催化分支酸到预酚酸转变的系列反应以及随后的通过预酚酸的氧化形成苯丙氨酸和酪氨酸的反应。第一个反应很有趣，因为它是少数的严格单一底物酶反应中的一个，它需要一个侧链从环的一部分移动到另一部分，如下图所示。



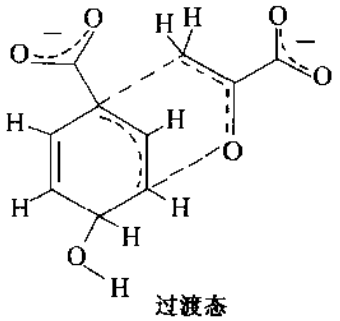
分支酸　　预酚酸

(a) 预测一个可能的过渡态中间体的结构。

(b) 指出这个酶的一个过渡态类似物，它是这个酶的有效抑制剂。

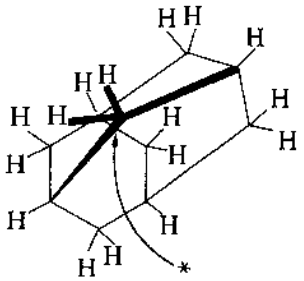
答：

(a) 通过轨道计算，P. R. Andrews 和 G. D. Smith 于 1973 年提出了如下所示的过渡态分子：



过渡态

(b) Andrews 和 Smith 认识到过渡态分子和金刚烷分子结构相似。



金刚烷

金刚烷分子有一个外部亚甲桥（图中星号）与六元环结合，因此稳定了笼形结构。

作者随后确实证明金刚烷衍生物是分支酸变位酶的有效抑制剂。所以，这些就是过渡态类似物的例子。

注：因这个酶没有在哺乳动物中发现，所以这个酶的抑制剂也许对控制细菌感染具有有效作用。可以肯定，种选择性毒性是发展新的抗菌制剂的重要方向。

8.10 溶菌酶是眼泪中的一种酶。它水解细菌细胞壁的多糖，其作用机制是了解得最清楚中的一个。溶菌酶是一个由 129 个氨基酸折叠成像一个膨胀小麦粒的单一多肽链，在一侧有一个裂缝。底物恰好可以嵌入这个裂缝，溶菌酶的底物是由 *N*－乙酰氨基葡糖（NAG）和 *N*－乙酰胞壁酸（NAM）的交替单位组成。通过 X 射线晶体学分析获得了竞争性抑制剂 $(NAG)_3$ 结合到它活性位点的细节，X 射线结构从分子内部观察到酶与底物的结合，如与 $(NAG\text{-}NAM)_3$ 的结合（见图 8－2，关于活性位点和结合基团的模式图）。

溶菌酶催化残基（4）的碳 1 和残基（5）糖苷键上的氧原子之间键的断裂。在这个键区域的两个氨基酸侧链分别为质子供体和受体：Asp52 和 Glu35，每个残基离这个键大约 0.3nm。Asp52 处于一个极性环境，在溶菌酶的最适 pH（pH5）下离子化，而 Glu35 在非极性区域，也不离子化。图 8－3 是提出的催化机制。

(a) 溶菌酶属于哪一个 EC 类，它的 EC 编号的前两位数字是什么？

(b) 请用文字描述图 8－3 中 $(NAM\text{-}NAG)_3$ 键断裂的各个基本化学过程。

(c) 溶菌酶的催化作用是共价催化还是非共价催化？

(d) 底物 $(NAM\text{-}NAG)_3$ 与酶结合的键属于什么类型？

(e) 在酶与底物结合时，糖残基（4）从结合前的椅式构象变为了半椅式构象，这对酶的催化有何帮助？

答：

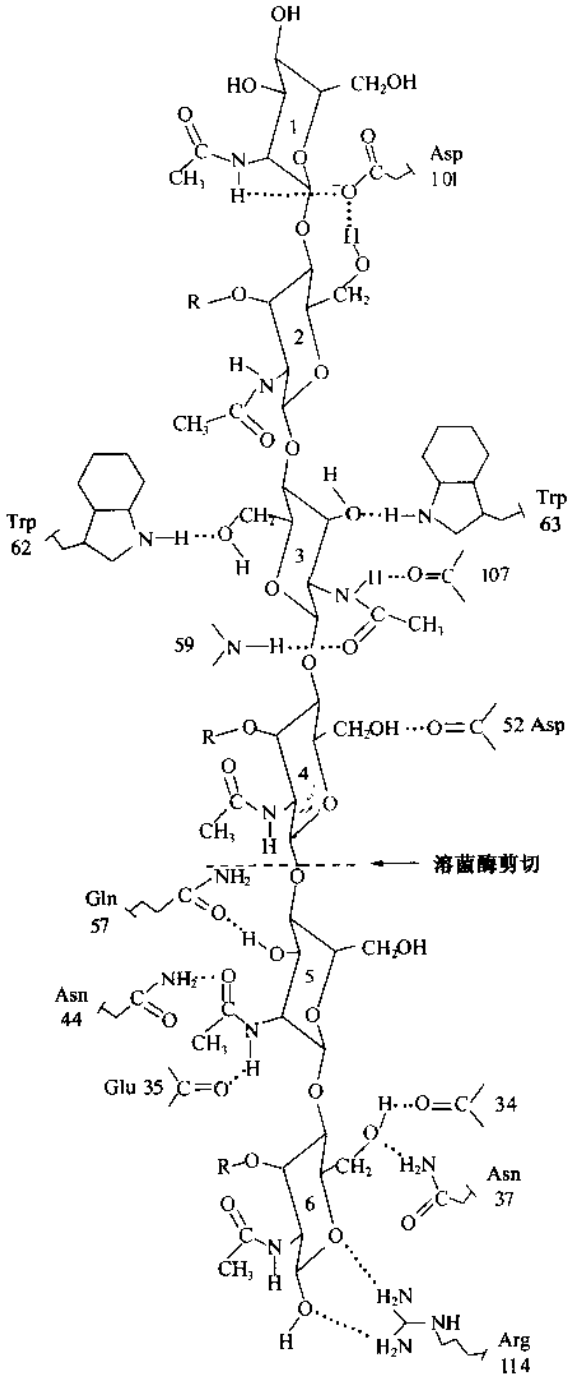


图 8-2　溶菌酶的活性位点与底物 $(NAG\text{-}NAM)_3$ 的结合。底物以粗键表示，酶的基团以细键表示，氢键以点划线表示

(a) 溶菌酶为水解酶，因此其 EC 编号（表 8.1）的第一个数字是 3。因为它催化 C—O 键的水解，所以它的第二个数字为 2（表 8.2）。

(b) Glu35 的羧基提供了一个质子，使 C-1—O 键断裂并释放出二糖[5]-[6]。所以环[4]上的 C-1 成为碳正离子，它通过带负电荷的 Asp52 而稳定。碳正离子接着与溶剂水的 OH^- 反应释放出一个四糖[1]-[2]-[3]-[4]。之后，Glu35 重新质子化，为下一轮反应作好准备。因谷氨酸是反应中的电子供体，因此可将反应归于一般的酸催化作用。

(c) 因为电子供体是催化反应的关键，因此这是一个一般酸碱催化的例子，很明确，它是酸催化并且非共价。

(d) 在图 8－3 中，氨基酸残基的 O 和 NH 之间及寡糖的 O 和 NH 之间的点划线代表氢键。但非共价结合的范德华引力也存在。

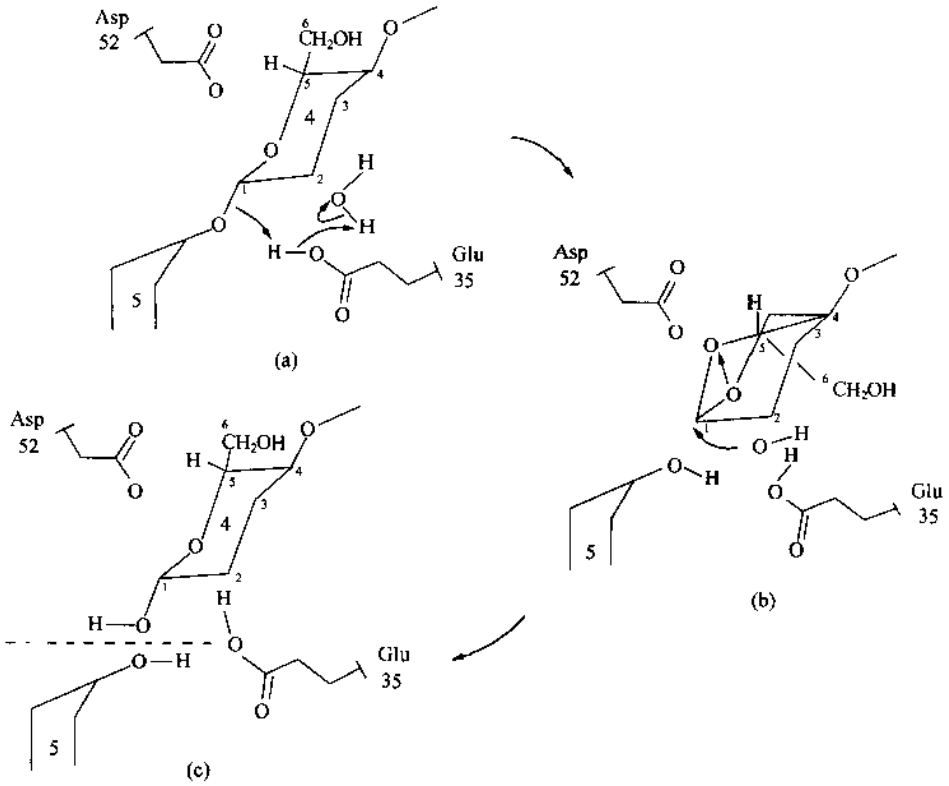


图 8－3　溶菌酶催化键断裂的可能机制。粗的实线结构代表底物，细线基团为酶的基团，小箭头代表反应中电子对的置换

(e) 与底物的结合导致残基 [4] 结合前椅式构象的扭曲，这个变化减少了结合趋势，即结合的 ΔG 将提高。但是，扭曲（张力）能量有助于通过正碳离子的形成而导致的连续的键断裂所需要的总活化能提高。

8.11　羧肽酶 A（EC 3.4.17.1）是一个 M_r 为 36 000，含 307 个氨基酸残基的单一多肽链组成的胰消化酶。它催化多肽链 C 端氨基酸残基的断裂。

更为重要的是，在其催化过程中，它的活性位点有一个 Zn^{2+}。它的活性位点和催化序列的氨基酸侧链如图 8－4 所示。

(a) 羧肽酶属于哪一类酶？

(b) Zn^{2+} 在催化机制中起到什么基本作用？催化属于哪一类型？

(c) 用文字描述图 8－4 中的系列反应。

答：

(a) 羧肽酶是一种水解酶，它催化肽键的水解断裂。EC 编号的第二个数字 3 表明它催化 C—O 键的水解。羧肽酶是外肽酶，它从肽链的羧基末端水解氨基酸残基。而氨肽酶催化 N 端氨基酸残基的水解，内肽酶既不从 C 端，也不从 N 端，而是从肽链内部水解肽键的水解酶，例如胃中的胃蛋白酶以及胰肽酶，如胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶。

(b) Zn^{2+} 作为亲电体在酶的 Glu270 的 γ 羧基与羰基氧之间酯键的形成之前将羰基氧

进一步极化。这个酯键为共价键，所以这个反应是共价催化的例子。

(c) (1) 肽链底物与酶的活性位点结合，酶的活性位点包括 Arg145、Zn^{2+} 和含有芳香族和脂肪族氨基酸侧链的疏水袋。(2) Glu270 对肽键的亲核性攻击伴随着 Glu270 从 Tyr248 吸收一个 H^+。(3) 肽键的断裂和 C 端游离氨基酸的脱离。(4) 通过水分子对 Glu270 的酸酐键的亲核性攻击，使共价结合肽链释放，从而使自由酶再生，这个过程伴随 Tyr248 的重新质子化。

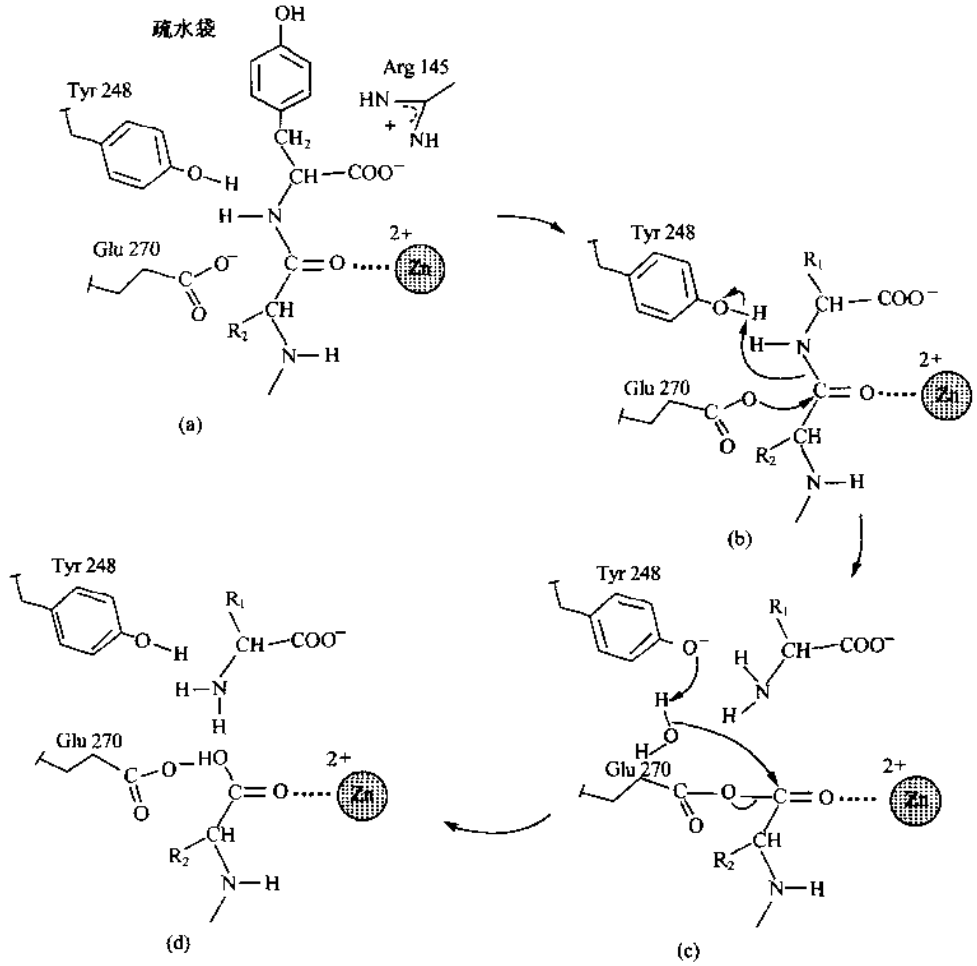


图 8-4　通过羧肽酶 A 催化从肽链 C 端水解氨基酸残基的共价催化机制。反应从 (a) 到 (d)，粗线结构代表肽链底物，(a) 中的肽链 C 端的酪氨酸侧链在 (b)、(c) 和 (d) 中以 R_1 表示

速率的提高和活化能

8.12　如果将酶的过渡态复合物及底物的活化能均减半时，计算反应速率将提高多少？

答：

从方程式 (8.2) 可知，k 与 $e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}$ 成比例，因此，

$$k_{新} = k_{旧} \exp\ (-\Delta G^{\ddagger}/RT)$$

很显然，速率的提高与初始 $\Delta G^{\ddagger}$ 以及温度相关。所以，只有 $\Delta G^{\ddagger}$ 和温度值已知，才能计算速率提高了多少。

8.13　如果前一个问题中的 $\Delta G^{\ddagger}$ 和 T 分别为 -1kJmol^{-1} 和 300K，那么速率提高因子为多少？

答：

$$k_{新} = k_{旧} \exp\left[1\,000/\left(2\times 8.314\times 300\right)\right] = k_{旧}\,1.22$$

因此，速率将提高22%。很显然，酶作用的速率有一个戏剧化的提高，表明在第一种情况下（即在自由溶液中）$\Delta G^{\ddagger}$ 较大，酶的反应速率大大降低（比这个问题中讨论的情况低两倍）。

补充问题

8.14　画出下列反应中底物和产物的结构并说明催化这些反应的酶的一般EC分类：

(a) 葡萄糖-6-磷酸 + H_2O $\xrightarrow[\text{葡萄糖-6-磷酸酶}]{}$ ……

(b) 乳酸 + NAD^+ $\underset{\text{乳酸脱氢酶}}{\rightleftharpoons}$ $NADH + H^+$ + ……

(c) 精氨琥珀酸 $\underset{\text{精氨琥珀酸酶}}{\rightleftharpoons}$ 延胡索酸 + ……

(d) 延胡索酸 + H_2O $\xrightarrow[\text{延胡索酸酶}]{}$ ……

8.15　乙醇脱氢酶催化各种醇氧化为相应的醛。如果底物浓度（$molL^{-1}$）和酶量确定，下列底物的反应速率不同：甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、环己醇、苯酚。(a) 以反应速率降低的顺序将上述底物重新排列。(b) 请解释排列的原因。

8.16　甘油醛-3-磷酸脱氢酶的活性位点有一个重要的半胱氨酸残基。这个酶可和其底物甘油醛-3-磷酸形成一个短暂的酰基化合物。(a) 这个化合物的化学名称是什么？(b) 画出它的可能结构。

8.17　被下列酶催化的反应有什么基本区别：(a) 变位酶和异构酶；(b) 氧化酶、加氧酶和催化逆反应的还原酶？请举例说明。

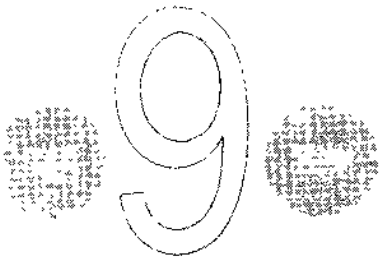
8.18　假定 CO_2 的自动水合作用相当快（例8.4），那么从生理角度出发，需要碳酸酐酶的合理解释是什么？

8.19　什么是一个酶的自杀底物？

8.20　与反应物浓度相比，如果一个反应混合物中的酶浓度达到平衡，那么产物浓度与底物浓度的比值是否与没有酶存在时一样？

8.21　为什么许多酶与它们的底物有很大的关系？

8.22　举出一些酶小于其底物的例子。



酶动力学

9.1 导言和定义

酶动力学是研究酶反应的速率以及影响此速率的各种因素的科学。

问题：酶反应速率由什么因素决定，为什么这个因素很重要？

影响酶反应速率最重要的因素是底物和酶的浓度以及 pH、温度、是否存在辅因子和金属离子等其他因素。这些因素的研究非常重要。从实用意义上讲，对它们的研究就有可能实现对一个特殊反应的速率进行最优化处理。依赖于实验变量的速率研究的方法可将预测酶作用的可能模式即酶的作用机制。

除了酶动力学的实验方面如实验的设计以及确定酶反应进行的方法之外，另一个重要方面就是数据的解释。数据的解释通常依赖于写出模式反应图的数学表达式，这些数学表达式预测了速率怎样依赖于反应变量，以及验证这些方程式与实验数据的一致性，这些实验数据也可能反驳与预测行为不符的模型。

酶动力学分析经常用到的基本原则和定义将在下面讨论。

质量作用的定律

一个化学反应的单一、不可逆步骤，即一个基本化学过程，其反应速率与反应过程中反应物的浓度成比例。这个比例常量称为速率常数，或为了突出所参与的为基本过程而称为单一速率常数。一个微妙之处在于在速率表达式中引入化学活度（第 10 章），而不是使用简单的浓度，但活化系数在生物系统中基本上都接近于 1。

例 9.1

将质量作用定律应用于反应模式

$$A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P + Q$$

k_1 和 k_{-1} 分别表示正向和逆向反应速率常数，所以正反应和逆反应速率可以用下列表达式表示：

$$\begin{aligned} \text{正向速率} &= k_1[A][B] \\ \text{逆向速率} &= k_{-1}[A][B] \end{aligned} \tag{9.1}$$

其中方括号代表摩尔浓度 $mol\,L^{-1}$。在化学平衡时，正反应和逆反应速率相等，所以随时间变化没有任何反应物的净产生。因此，

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[P]_e[Q]_e}{[A]_e[B]_e} = K_e \tag{9.2}$$

其中 K_e 被称为平衡常数，下标 e 代表浓度的平衡值。

反应速率是每时间单位的一种物质简单的浓度变化，因此，反应速率可用导数的数学关

系式求出。但请注意，数学表达式中［A］的全部变化速率一定包括正向和逆向变化。例如，

$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[P][Q] \tag{9.3}$$

反应分子数

反应分子数指参与一个基本反应的分子数目。通常，基本反应指只有两个分子在一瞬间碰撞而产生产物（反应分子数＝2）或一个分子发生裂变（也称为分裂，反应分子数＝1）。例 9.1 是一个正向和逆向过程中反应分子数均为 2 的反应。

一个反应的级数

这是指动力的总和，所谓动力即在一个速率表达式中所提及的浓度（或化学活度）。

例 9.2

在一级反应中

$$A \xrightarrow{k} P$$

［A］变化速率的表达式为

$$\frac{d[A]}{dt} = -k[A] \tag{9.4}$$

因为表达式的左手边是反应速率单位（$molL^{-1}s^{-1}$），所以右手边的单位也一定是这个单位（量纲平衡）。因此，k［A］的单位肯定为 $molL^{-1}s^{-1}$，意味着 k 的单位是 s^{-1}。所以，在一个特殊的反应模式中，简单的量纲分析可因为一个特殊常数的单位而直接得到一般表达式。

9.2　依赖于底物浓度的酶反应速率

实验时，底物浓度对酶反应速率的效应能够通过记录一个固定浓度的酶和一系列不同浓度的底物的酶促反应过程而进行研究。初始速度 v_0 是当时间 $t=0$ 时曲线切线的斜率。初始速度很有用，因为反应中酶的降解或反应产物的抑制可能发生，这样就会使产生难以解释的结果。

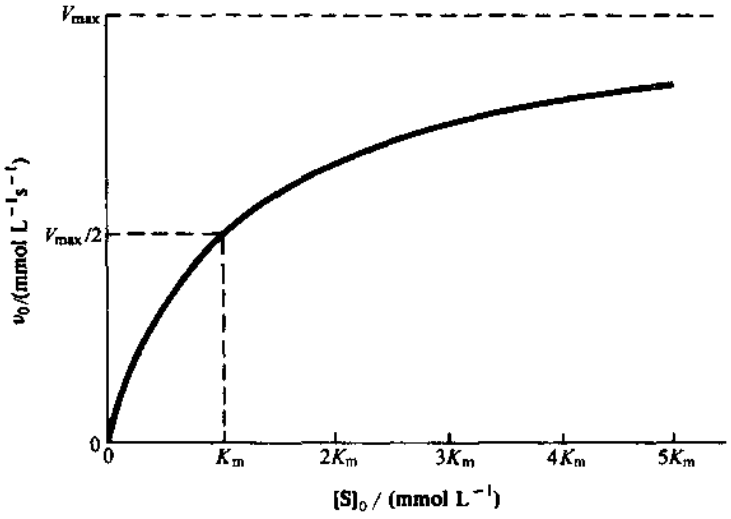


图 9－1　一个酶促反应中初始速度（v_0）与初始底物浓度 $[S]_0$ 的双曲线关系

当 $[S]_0$>酶浓度时，v_0 通常与反应混合物中酶的浓度成正比，并且对大多数酶而言，v_0 是 $[S]_0$ 的矩形双曲型函数。当存在其他（共）底物时，在 $[S]_0$ 变化的一系列实验中，它们通常为常量。

通常表示酶反应数据的矩形双曲线的方程式被称为米氏方程（图9-1）：

$$v_0 = -\left(\frac{d[S]}{dt}\right)_{t=0} = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0} \tag{9.5}$$

当 $[S]_0$ 非常大时，$v_0 = V_{max}$（称作最大速度）；而当 $v_0 = V_{max}/2$ 时，$[S]_0$ 的值为 K_m，即所谓的米氏常数。

9.3 K_m 和 V_{max}的图解求值

当一个新变量对另一个新变量作图时，方程式（9.5）可以重新写为几种能产生直线的新形式。这种处理的优点在于①通过使一条直线与变化的数据相符，V_{max}和 K_m 能被迅速确定；②偏离于一条直线的数据比偏离于双曲线的数据更易观察到（偏离表明不适合于简单酶模型）；③反应中抑制剂的效应更易于分析。另外从一条直线上获得外推截距比从一条矩形双曲线通过眼睛估计其渐近线更容易且更准确。

最经常应用的米氏方程的变换形式是 Lineweaver-Burk 的“双倒数”方程。

这个方程于 1935 年第一次提出。将方程式（9.5）两侧均取倒数，可得到

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}} \tag{9.6}$$

将数据对（$1/[S]_{0,i}$，$1/v_{0,i}$）作图，其中 $i=1\cdots n$，n 是数据对的数目。分别以 $1/V_{max}$ 和 $-1/K_m$ 为纵坐标和横坐标的截距，作图得到一条直线（图9-2）。

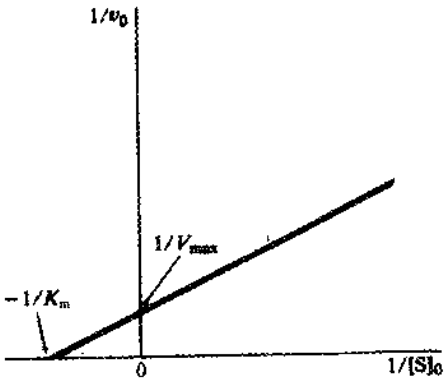


图9-2 Lineweaver-Burk 图解过程，以确定米氏方程的两个稳态动力学参数

问题：图解过程还被用于获得最佳稳态参数的估算吗？

由于计算机的应用，图解方法已很大程度上被动力学方程式的非线性最小平方回归程序代替，其中动力学方程式直接由非变化数据而来。但是，图解过程对参数值的快速预计或数值法需要的初始估算仍然有效。

9.4 酶抑制的定义

酶反应速率经常受底物而非反应物的影响，当一个化合物引起速率降低时，这个化合物被称作抑制剂。正好与上述效应相反，一个激活剂能使反应速率提高。在研究抑制剂时，将实验观察的效果和所提出解释它们的机制（或模式）加以区别非常重要。

抑制有三种基本类型，它们被定义为抑制度 i，而 i 本身的定义为：

$$i = \frac{v_0 - v_i}{v_0} \tag{9.7}$$

其中 v_0 和 v_i 分别为非抑制和抑制时的初始反应速率。

1. 如果 i 不受底物浓度的影响，那么存在的为单纯非竞争性抑制。

2. 如果当底物浓度提高时，i 下降，那么存在竞争性抑制。

3. 如果当底物浓度提高时，i 上升，那么存在反竞争性抑制。

除上述情形之外，还存在混合抑制。如果当底物浓度上升时，i 上升或下降，但分别与单纯竞争性抑制及反竞争性抑制的程度不同，这时存在的即为混合抑制。

事实上，从作用机制看，非竞争性抑制是混合抑制的一种特殊情况；但是，就象这里所定义的，混合抑制是三种基本类型中两种的组合。

9.5 酶抑制方程

有关反应速率和抑制剂浓度的数学表达式通常都相当复杂，但米氏方程有四种简单的扩展方程式。这些方程式值得特别考虑，因为许多酶的动力学都能很好地被这些方程式描述。表 9.1 的方程式中，[I] 代表抑制剂浓度，K_I 和 K'_I 为抑制常数，单位为一个离解平衡常数的单位（mmol L^{-1}）。与这些方程式相一致的机制将在 9.10 节中进行讨论。

表 9.1　四种类型酶抑制的速率方程式

单纯非竞争性抑制	单纯竞争性抑制
$v_i = \dfrac{V_{max}[S]_0}{(K_m + [S]_0)\left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right)}$ $i = \dfrac{[I]}{K_I + [I]}$	$v_i = \dfrac{V_{max}[S]_0}{K_m\left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right) + [S]_0}$ $i = \dfrac{K_m \dfrac{[I]}{K_I}}{K_m\left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right) + [S]_0}$
反竞争性抑制	**混合抑制**
$v_i = \dfrac{V_{max}[S]_0}{K_m + \left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right)[S]_0}$ $i = \dfrac{[S]_0 \dfrac{[I]}{K_I}}{K_m + \left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right)[S]_0}$	$v_i = \dfrac{V_{max}[S]_0}{K_m\left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right) + \left(1 + \dfrac{[I]}{K'_I}\right)[S]_0}$ $i = \dfrac{[I]\left\{\dfrac{K_m}{K_I} + \dfrac{[S]_0}{K'_I}\right\}}{K_m\left(1 + \dfrac{[I]}{K_I}\right) + \left(1 + \dfrac{[I]}{K'_I}\right)[S]_0}$

9.6 米氏方程的基本机制

平衡分析

为了解释通过转化酶催化的蔗糖转化为葡萄糖和果糖的结果，Michaelis 和 Menten 于 1913 年提出了下列反应模式：

$$K + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

假设与 k_2 相比，k_{-1}较大。因此，反应的第一部分可用酶－底物复合物解离的平衡常数描述：$K_s = [E][S]/[ES]$。任意时间 S 和 E 的浓度可由已知的初始条件得到：

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \tag{9.8}$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \tag{9.9}$$

因为实验时 $[S]_0 \gg [E]_0$，所以反应早期的 $[S] \simeq [S]_0$，通过应用 K_s 的表达式和方程式 (9.9)，我们得到：

$$K_s = \frac{([E]_0 - [ES])[S]_0}{[ES]} \tag{9.10}$$

这个方程式新型重新整理后为

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0} \tag{9.11}$$

反应的第二步是一个简单的一级反应，因此

$$v_0 = k_2[ES] \tag{9.12}$$

所以描述底物降低的整个速率的方程式为

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0} \tag{9.13}$$

如果 $V_{max} = k_2[E]_0$ 并且 $K_m = K_s$ 时，它其实就是方程式 (9.5)。

稳态分析

1925 年，Briggs 和 Haldance 验证了早先的米氏分析并对此作出了重要发展。他们没有假设反应的第一阶段处于平衡，为了全部的意图和目的，他们只假设酶－底物复合物的浓度并不随时间变化，即它处于一个稳态。以数学表达式表示，即等于

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \tag{9.14}$$

现在，[ES] 变化的方程式为

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \tag{9.15}$$

通过应用方程式 (9.8) 和 (9.9)，以及 $[S] \simeq [S_0]$，那么

$$0 = k_1[E]_0[S]_0 - (k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)[ES] \tag{9.16}$$

通过重新整理这个方程式，并将 $v_0 = k_2[ES]$ 带入，我们得到

$$v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{\frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} + [S]_0} \tag{9.17}$$

如果 K_m 与 $(k_{-1} + k_2)/k_1$ 相等，V_{max} 与 $k_2[E]_0$ 相等，这个方程式就又一次与方程式 (9.5) 一样。

方程式 (9.17) 有几个特征值得注意：

1. 因为 k_2 描述了每秒每摩尔酶将底物转变为产物的摩尔数，因此称 k_2 为酶的转换数。一般而言，在许多复杂的酶机制中，V_{max} 的表达式很复杂，因 k_2 被一个表达式代替，这个表达式为单一速率常数下产物总量的比例，这个组合的表达式被称为 k_{cat}。
2. 如果一个酶不纯，也许就不可能准确确定它的活性浓度，即 $[E_0]$。但是，V_{max} 仍可通过稳态动力学分析获得。

   所以，为了使实验结果标准化，我们指定一个酶单位（或开特）为：在标准 pH、离子强度和温度条件下，1 分钟将 1mmol 底物转化为产物所需要的酶溶液的量。
3. 当与 K_m 相比，$[S]_0$ 很大时，事实上所有的 E 均为 ES 形式。所以，此时的酶处于饱和状态，即它以最大速度进行作用。

9.7 复杂的稳态方程式的推导

原则上，任何酶、任何数量的反应物的稳态速率表达式均可通过应用前一部分介绍的方法进行推导。但事实上，推导过程非常麻烦。所以可以应用 1956 年由 King 和 Altman 介绍的一种算法进行推导。这种方法不适于①非酶反应（每一个反应物浓度必须≫ $[E]_0$），②酶

混合物，③非酶步骤的反应。但这些并非严格的限制，它可应用于：

1. 画出反应图解，需要用反应箭头将所有相关酶类（游离及复合形式）相连接。
2. 以相应的单一速率常数注释所有的反应箭头。底物参与的正反应中，将代表底物的字母与速率常数相邻；参与逆反应的产物也是同样。
3. 对于 n 种酶形式（一种为游离酶，其余为酶的复合物或酶的异构体形式），画出反应模式图。模式图中有 $n-1$ 个箭头，同时产生一个连续途径或产生了每一种酶形式的。另外，模式图中不允许有闭环步骤。
4. 每一个模式图的总产物浓度及速率常数可给出的 $[ES_i] \cdot [E]_T$ 表达式，其中 $[ES_i]$ 为任何酶形式，$[E]_T$ 为总酶浓度。
5. 单独的产物形成的整体速率的表达式可通过相关酶－底物复合物浓度（$[ES_k]$ 以及一级速率常数（k_j）的相乘而给出：

$$v = \frac{k_j[E]_T[ES_k]}{([E] \text{和各种} [ES_i] \text{表达式总和，此处的} i = 1, \cdots, n-1)} \tag{9.18}$$

在应用该算法时，应注意：

(a) 所有机制均不涉及变换的反应顺序，速率表达式的分子将只有两个项：一个为所有在正向速率常数和底物浓度条件的产物［如方程式（9.18）］，另一个为逆反应的相应产物。

(b) 复杂机制中，很容易忽略上面步骤 3 中的一些模式。对 m 步骤产生的总数为 $(n-1)$行的模式（其中 n 为酶形式的总数），一个有用的公式为

$$\text{总}(n-1)\text{行模式} = \binom{m}{n-1} = \frac{m!}{(n-1)!(m-n+1)!} \tag{9.19}$$

(c) 方程式（9.19）预测了（$n-1$）行模式的数目，其中有一些也许是闭环的，闭环模式必须除去。有 r 条边闭环的（$n-1$）行模式的总数 Z 等于

$$Z = \binom{m-r}{n-1-r} = \frac{(m-r)!}{(n-1-r)!(m-n+1)!} \tag{9.20}$$

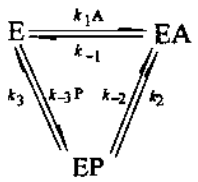
因此，Z 的范围为 1 到 $n-1$，所有这些 Z 值的总和是被排除的模式总数。

例 9.3

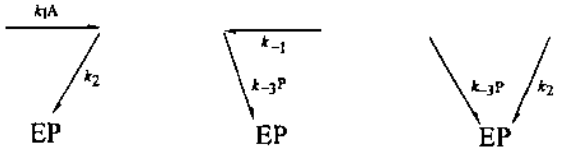
通过应用 King-Altman 的推导步骤，推导下列酶机制的稳态方程式：

$$A + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EA \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EP \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E + P$$

步骤（1）和（2）：主模式为：



步骤（3）：EP 的反应模式为：



步骤（4）：因此，

$$[EP] = k_1k_2[A] + k_{-1}k_{-3}[P] + k_2k_{-3}[P] \tag{9.21}$$

与之相似，另外两种酶的表达式为

$$[EA] = k_1k_{-2}[A] + k_{-2}k_{-3}[P] + k_1k_3[A]$$

$$[E] = k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2}$$

因为

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[EP] - k_{-3}[E][P] \tag{9.22}$$

并且

$$[E]_T = [E] + [EA] + [EP] \tag{9.23}$$

因此

$$v = \frac{[E]_T|k_3(k_1k_2[A] + k_{-1}k_{-3}[P] + k_2k_{-3}[P]) - k_{-3}[P](k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2})|}{k_1k_2[A] + k_{-1}k_3[P] + k_2k_{-3}[P] + k_1k_{-2}[A] + k_{-2}k_{-3}[P] + k_1k_3[A] + k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2}} \tag{9.24}$$

简化为

$$v = \frac{[E]_T(k_1k_2k_3[A] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}[P])}{(k_{-1}k_3 + k_2k_3 + k_{-1}k_{-2}) + k_1(k_2 + k_3 + k_{-2})[A] + k_{-3}(k_{-1} + k_2 + k_{-2})[P]} \tag{9.25}$$

如果 [P] =0，则方程式 (9.25) 的表达式将变为下列形式

$$v = \frac{[E]_T(\text{num1})[A]}{\text{coef} + \text{coefA}[A]} \quad 或 \quad v = \frac{[E]_T\left(\frac{\text{num1}}{\text{coefA}}\right)[A]}{\left(\frac{\text{coef}}{\text{coefA}}\right) + [A]} \tag{9.26}$$

其中 num1 相当于分子系数，coef 和 coefA 分别代表两个分母系数。当分子和分母同被 coefA 相除，方程式 (9.26) 的形式就与米氏方程—方程式 (9.5) 一致。因此，以上分析说明稳态酶动力学的重要作用：引入仅涉及在酶复合物（此情况下的 EP）间的异构化步骤的机制并不引起稳态速率方程式形式（见下一部分）的变化。

9.8 多反应物酶

概说

最普通的酶反应是有两个或多个底物和与底物个数相同的产物的反应。但许多更简单的单一底物模式对酶反应速率动力学概念（与 pH、温度等效应相关）的发展更具价值。尽管多底物反应的机制很复杂，但它们的动力学常以下列方程式描述：

$$v = \frac{V_{max}^{app}[A]}{K_m^{app} + [A]} \tag{9.27}$$

如果实验中除 A 以外的底物浓度均控制为常量，就得到以上方程式。V_{max}^{app}和 K_m^{app}值是其他反应物浓度的函数（例 9.6）。

命名原则

1963 年，W. W. Cledand 在反应中底物和产物数目的基础上，发表了有关酶促反应的分类。其内容如下：

1. 反应物是动力学上有意义的底物或产物的数目，一般以音节 Uni (1)、Bi (2)、Ter (3) 和 Quad (4) 表示。

例 9.4

下面反应 Cleland 的相关命名为

$A \rightleftharpoons P$	Uni Uni
$A \rightleftharpoons P + Q$	Uni Bi
$A + B \rightleftharpoons P + Q$	Bi Bi
$A + B + C \rightleftharpoons P + Q + R + S$	Ter Quad

2. 如果在任何产物排出之前，所有底物就加入到酶中，那么其机制就规定为顺序机制。

如果底物的加入按照强制性顺序，那么作用机制称为有序机制。如果底物的加入和产物的排出没有强制性顺序，就称为无序机制。当一个或更多产物在所有底物加入之前排出，酶将以反应过程中来回振动的两种或多种稳定形式存在，这种类型的机制因此被称为乒乓机制。与瞬间存在形式不同（例如例 9.5 中的 EAB、EPQ），如果有稳定的异构化的酶形式存在，术语 Iso 将加入所命名的机制中。

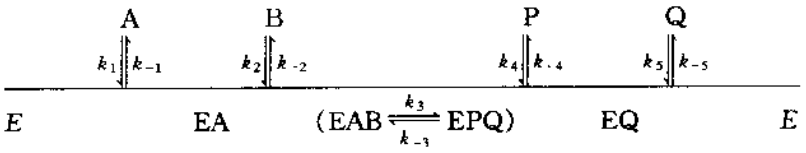
例 9.5

有序 Bi Bi 机制可表达为

$$E + A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} EA \qquad EA + B \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} EAB \qquad EAB \underset{k_{-3}}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} EPQ$$

$$EPQ \underset{k_{-4}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} EQ + P \qquad EQ \underset{k_{-5}}{\overset{k_5}{\rightleftharpoons}} E + Q$$

或应用 Cleland 的图解惯例[1)]，可简单地写为



按照 Cleland 的常规，字母 A、B、C、D 代表底物，P、Q、R、S 代表产物，并且分别以它们加入和离开酶的顺序排列。

例 9.6

通过应用 King-Altman 算法程序，上一个例子中的有序 BiBi 机制的速率表达式如下所示：

$$\begin{aligned} v = {} & (k_1k_2k_3k_4k_5[A][B] - k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4}k_{-5}[P][Q]) \\ & \div |k_5k_{-1}(k_3k_4 + k_4k_{-2} + k_{-2}k_{-3}) \\ & + [A]k_1k_5(k_3k_4 + k_4k_{-2} + k_{-2}k_{-3}) \\ & + [B]k_2k_3k_4k_5 + [P]k_{-1}k_{-2}k_{-3}k_{-4} \\ & + [Q]k_{-1}k_{-5}(k_3k_4 + k_4k_{-2} + k_{-2}k_{-3}) + [A][B]k_1k_2(k_3k_4 + k_3k_5 + k_4k_5 + k_5k_{-3}) \\ & + [P][Q]k_{-4}k_{-5}(k_3k_{-1} + k_{-1}k_{-2} + k_{-1}k_{-3} + k_{-2}k_{-3}) + [A][P]k_1k_{-2}k_{-3}k_{-4} \\ & + [B][Q]k_2k_3k_4k_{-5} + [A][B][P]k_1k_2k_{-4}(k_3 + k_{-3}) \\ & + [B][P][Q]k_2k_{-4}k_{-5}(k_3 + k_{-3})| \end{aligned} \tag{9.28}$$

如果我们假设反应开始 [P] 和 [Q] =0，那么这个表达式可以戏剧化地简化。而且，如果 [B] 是饱和的，我们可将分子和分母均除以 [B]，并取其极限值即 [B] →∞，方程式将简化为

$$v_0 = \frac{\text{num1}[A]_0}{\text{coefB} + \text{coefAB}[A]_0} \tag{9.29}$$

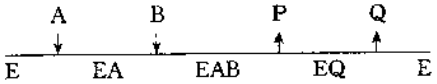
其中术语 num1、coefAB 和 coefB 与方程式（9.28）相同。因此，V_{max} 和 K_m 的表达式分别为

$$V_{max} = \frac{\text{num1}}{\text{coefAB}} \tag{9.30}$$

$$K_m = \frac{\text{coefB}}{\text{coefAB}} \tag{9.31}$$

与 B 相关的参数的表达式也可以通过相似方法得到。

1）在原来的 Cleland 符号系统中只使用单箭头表示，该机制可写成：



9.9 pH对酶反应速率的影响

概说

问题：什么对于研究pH对酶反应速率的影响非常有用？

实际上，大家也许只是想找到一个催化反应的最有效的pH值，即最适pH值。另外，pH对酶反应动力学的影响的完全和仔细的研究也许会导致对参与结合或催化作用的酶或底物的功能基团的了解。

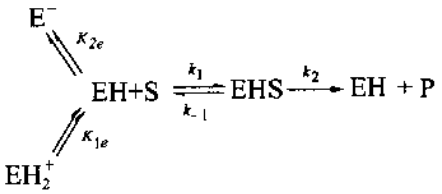
要完全描述pH变化对酶催化反应的影响，几乎是一个不可能完成的任务。酶中的许多氨基酸侧链是可电离的，但它们在极性环境中与非极性溶液中的不同，它们的pK_a（第3章）将明显地改变。然而，从实验角度出发，在各种pH条件下，确定一个酶的稳态动力学参数（K_m、V_{max}）是一件很简单的事情。

pH可能引起下列基团离子状态的变化：①参与催化的基团，②与底物结合的基团，③结合于非活性位点的基团，这些位点被定义为异位效应物位点，④底物上的基团。电荷状态的改变将影响酶及其底物的亲和力以及催化作用的速率。

pH效应的一个简单模型

游离酶的离子化

分析酶的离子化对酶动力学参数的效应的最简单的米氏模型为



其中

$$K_{2e}=\frac{[E^-][H^+]}{[EH]} \qquad K_{1e}=\frac{[EH][H^+]}{[EH_2^+]} \qquad K_s=\frac{[EH][S]}{[EHS]} \tag{9.32}$$

对应于这个模型的速率表达式可通过应用米氏平衡分析迅速得到。酶的质量守恒方程式为

$$[E]_0=[E^-]+[EH]+[EHS]+[EH_2^+] \tag{9.33}$$

通过应用方程式（9.33）的关系式，可得到

$$[EHS]=\frac{[E]_0}{1+\frac{K_s}{[S_0]}\left(1+\frac{K_{2e}}{[H^+]}+\frac{[H^+]}{K_{1e}}\right)} \tag{9.34}$$

因为$v_0=k_2[EHS]$，带入得

$$v_0=\frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_s\left(1+\frac{K_{2e}}{[H^+]}+\frac{[H^+]}{K_{1e}}\right)+[S]_0} \tag{9.35}$$

方程式（9.35）和米氏方程的V_{max}和$k_2[E]_0$的表达式相同，但

$$K_m=K_s\left(1+\frac{K_{2e}}{[H^+]}+\frac{[H^+]}{K_{1e}}\right) \tag{9.36}$$

这些方程式需注意下列事实：

(a) 对$[S]_0$和$[E]_0$的固定值，方程式（9.35）描述了一个钟形曲线，曲线在pK_{1e}和pK_{2e}之间的pH值时pK_m有最大值。以$-\lg$（表观K_m）$=pK_m$对pH作图，所得曲线见图9-3，在$pH=-1/2\lg(K_{1e}\times K_{2e})$时，$pK_m$为最大值，即反应的最适

pH值为（$pK_{1e}+pK_{2e}$）/2。

(b) 因为在任何pH值时，方程式（9.36）圆括号中的值总大于1，因此，$K_m>K_s$。

(c) H^+的浓度（即pH）对V_{max}没有任何影响。

(d) 如果$[H^+]>K_{2e}$，当pH较低（即$[H^+]$较高）时，方程式（9.35）变为

$$v_0=\frac{V_{max}[S]_0}{K_s\left(1+\frac{[H^+]}{K_{1e}}\right)+[S]_0} \tag{9.37}$$

这个方程式与将H^+作为抑制剂时的竞争性抑制方程式（表9.1）形式相同。

(e) 在低pH时，$K_m\cong K_s[H^+]/K_{1e}$，所以，$pK_m=pK_s+pH-pK_{1e}$，pK_m对pH作图得到一条斜率为1的直线（图9-3）。同样，在高pH时，$K_{1e}>K_{2e}>[H^+]$，$K_m\cong K_sK_{2e}/[H^+]$，并且$pK_m=pK_s+pK_{2e}-pH$，pK_m对pH作图得到一条斜率为-1的直线。

在中间pH范围内，当$K_{1e}>[H^+]>K_{2e}$，且$K_m\cong K_s$时，pK_m对pH作图得到一条水平线。所以通过水平线与两条直线相交之点即可估算出pK_{1e}和pK_{2e}（图9-3）。

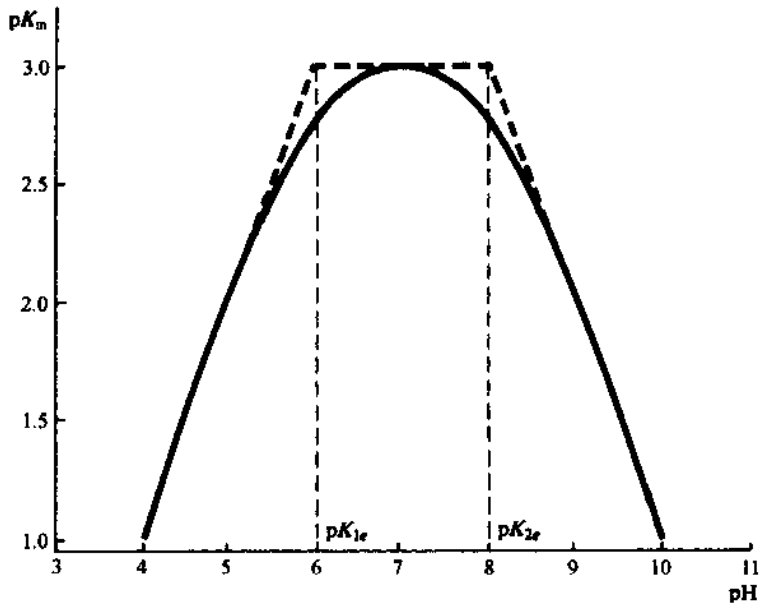


图9-3　酶模式图，图中以$-\lg$（表观K_m）$=pK_m$为纵坐标，pH为横坐标。方程式（9.35）中使用的参数为$K_s=10^{-3}$mol L^{-1}，$K_{1e}=10^{-6}$mol L^{-1}，$K_{2e}=10^{-8}$mol L^{-1}

9.10　酶抑制的机制

表9.1中给出的方程式简单地描述了酶的抑制行为，因此这些方程式可称为现象方程。但是，应用Michaelis和Menten对单一酶的描述方法描述其基本机制非常重要。这些机制能够解释抑制方程的形式。

竞争性抑制

竞争性抑制的最简单模式为

$$\begin{array}{ccccc} & & \mathrm{I} & & \\ & & + & & \\ \mathrm{E}+\mathrm{S} & \overset{k_1}{\underset{k_{-1}}{\rightleftharpoons}} & \mathrm{ES} & \xrightarrow{k_2} & \mathrm{E}+\mathrm{P} \\ {\scriptstyle k_I}\Big\| \Big\|{\scriptstyle k_{-I}} & & & & \\ \mathrm{EI} & & & & \end{array}$$

其中 $K_I = k_{-1}/k_1$，为酶抑制复合物的解离常数。

通过应用 Briggs 和 Haldane 的稳态分析，可表示为

$$v_0 = \frac{k_2[\mathrm{E}]_0[\mathrm{S}]_0}{\left(\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}\right)\left(1+\frac{[\mathrm{I}]}{k_{-1}/k_1}\right)+[\mathrm{S}]_0} \tag{9.38}$$

$$= \frac{V_{\max}[\mathrm{S}]_0}{K_\mathrm{m}\left(1+\frac{[\mathrm{I}]}{K_I}\right)+[\mathrm{S}]_0} \tag{9.39}$$

竞争性抑制的方程式（9.39）双倒数形式为：

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_\mathrm{m}}{V_{\max}}\left(1+\frac{[\mathrm{I}]}{K_I}\right)\frac{1}{[\mathrm{S}]_0} \tag{9.40}$$

这个方程式预测 Lineweaver-Burk 图的斜率将随着抑制剂浓度的上升而提高，但 $1/v_0$ ($1/V_{max}$)轴上的截距不会改变。不同浓度抑制剂的几个实验的一系列图均有相同的$1/v_0$截距，如图 9－4 (a)，表明竞争性抑制不改变 V_{max}。

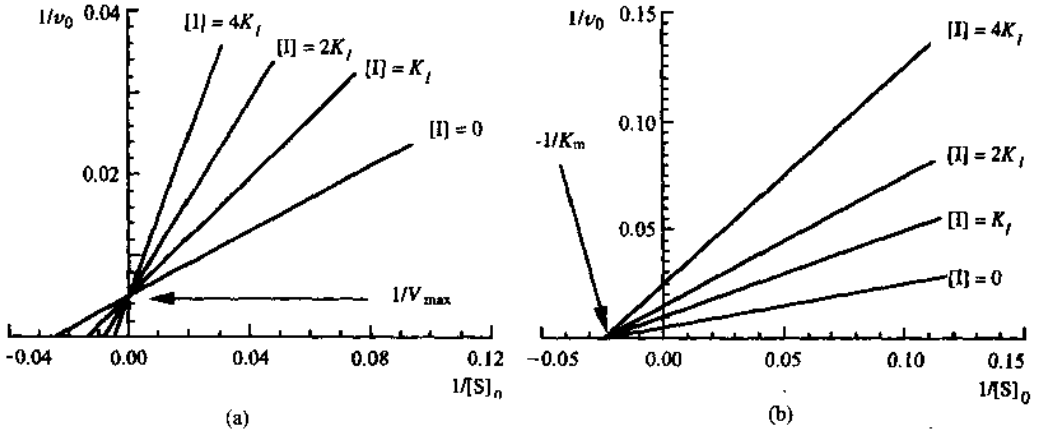


图 9－4 $1/v_0$ 对 $1/[\mathrm{S}]_0$ 所作的 Lineweaver-Burk 图，(a) 单纯的竞争性抑制和 (b) 单纯的非竞争性抑制

非竞争性抑制和混合抑制

非竞争性抑制和混合抑制的最简单模式为

$$\begin{array}{ccccc} \mathrm{I} & & \mathrm{I} & & \\ + & & + & & \\ \mathrm{E}+\mathrm{S} & \overset{k_1}{\underset{k_{-1}}{\rightleftharpoons}} & \mathrm{ES} & \xrightarrow{k_2} & \mathrm{E}+\mathrm{P} \\ {\scriptstyle K_I}\Big\| & & \Big\|{\scriptstyle K_I'} & & \\ \mathrm{EI} & & \mathrm{ESI} & & \end{array}$$

相应的速率方程式为

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)+\left(1+\frac{[I]}{K'_I}\right)[S]_0} \tag{9.41}$$

如果 $K_I \neq K'_I$，方程式就对应于混合抑制（表 9.1）。但如果 $K_I = K'_I$，其结果就为单纯的非竞争性抑制。因此，可以看出，从机制角度讲，单纯的非竞争性抑制是混合抑制的一种特殊情况。

$$\frac{1}{v_0} = \frac{(1+[I]/K_I)}{V_{max}} + K_m\frac{(1+[I]/K_I)}{V_{max}}\frac{1}{[S]_0} \tag{9.42}$$

这个方程预测 Lineweaver-Burk 图的斜率和 $1/v_0$ 截距均随抑制剂浓度的上升而提高。不同浓度抑制剂的几个实验的一系列图的所有 $1/[S]_0$ 截距见图 9－4（b），表明单纯的非竞争性抑制不改变 K_m。

反竞争性抑制

反竞争性抑制的最简单模式为

$$\begin{array}{ccccc} & & \mathrm{I} & & \\ & & + & & \\ \mathrm{E+S} & \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & \mathrm{ES} & \xrightarrow{k_2} & \mathrm{E+P} \\ & & \Big\Downarrow{\scriptstyle K_i} & & \\ & & \mathrm{ESI} & & \end{array}$$

其相应的速率方程式为

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0(1+[I]/K_I)} \tag{9.43}$$

在这种情况下，不同浓度抑制剂的几个实验中 $1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 的 Lineweaver-Burk 图的斜率为 K_m/V_{max}的平行线。

9.11　调节酶

概说

已深入讨论的酶动力学被称为米氏动力学。因为反应速率对底物浓度所作的图是一个单纯的矩形双曲线，所以变换形式后，以初始速度的倒数对底物浓度倒数所作的图为线性的。有两个或多个底物参加的反应中，当其他底物浓度固定时，对其中一个底物所作的图也为线性的。有很多酶遵守米氏动力学，也有许多酶并不遵守。这些酶的典型速度对底物所作的图为“S”状而不是双曲线，它们被称作控制酶或调节酶，它们经常位于一个代谢途径的开始或分支点。

例 9.7

代谢途径的最简单的调节形式是通过途径中的产物抑制酶的作用。图 9－5 中，E_1 代表酶，A 和 B 为代谢物，圆形的负号表示抑制作用。如果没有影响 A 的酶（E_1）抑制剂存在，那么 B 的浓度只依赖于它的合成及利用速率。如果 B 的利用速率下降或 B 由外源提供，它的浓度就会上升，也许甚至能达到中毒的水平。但是，如果 B 是第一个酶的抑制剂，当 B 的浓度上升，就会导致 B 对 E_1 抑制作用的提高，那么 B 的合成速率将下降。这种效应称为

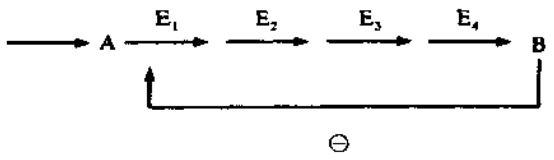


图 9－5

反馈抑制或负反馈控制，这个概念也用于描述电子电路。

例 9.8

分支代谢途径的控制要复杂得多。请看图 9－6 的代谢模式。在这里，B 与 C 反应，D 是这条途径较远的产物。为了最有效地控制 D，B 应该抑制第一个酶（E_1）而 C 应该激活它。这种情况下，如果 B 由外源提供，使 B＞C，那么 B 就会抑制由 A 而来的它自己的合成，B 和 C 的浓度就趋向于相等。

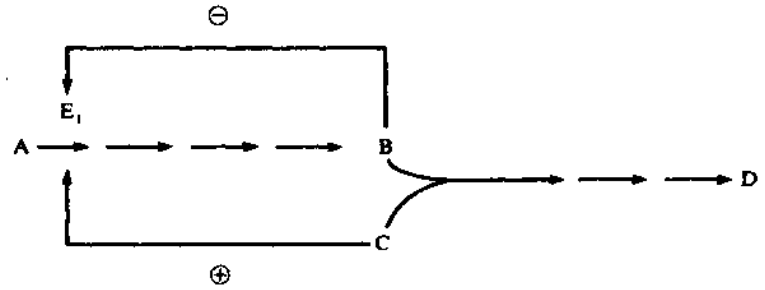


图 9－6

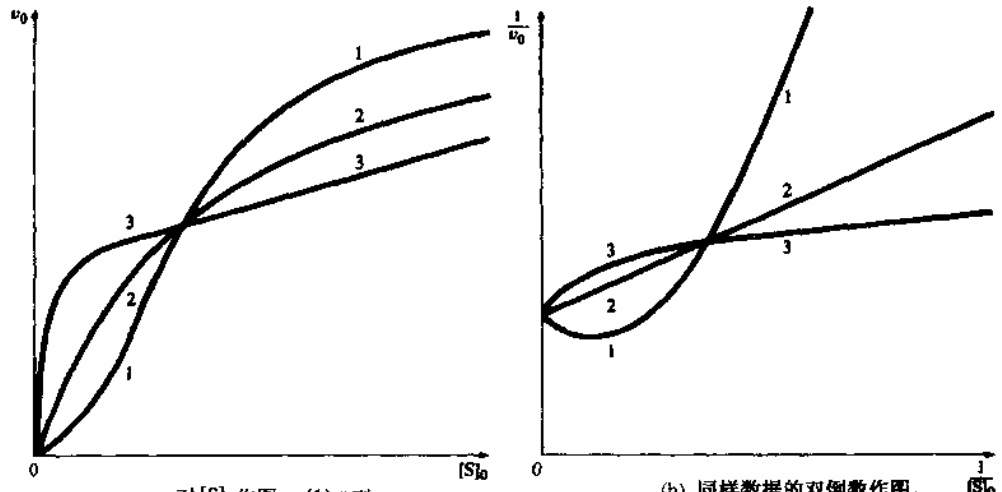
而如果 C＞B，C 将激活 B 的产生，这将同样导致 B 和 C 浓度趋于相等。C 的激活作用通常是 C 与 B 竞争 E_1 的同一个位点的结果，因此 B 的抑制作用就降低。嘧啶合成的第一个酶，天冬氨酸氨甲酰基转移酶在大肠杆菌中即为此类型的控制（第 15 章的例 8.5），其中 B 为 CTP，C 为 ATP，D 为核酸。

调节酶的动力学表现

通常效应物分子与酶作用的底物很少在结构上相似，因此，这种控制并非结合到活性位点而是另外一个位点即变构位点。通过蛋白质的构象变化来调节活性位点的反应效率。

如果一个酶的一个效应物同时也为底物，我们把这种调节称作同促效应；如果是非底物，则称为异促效应。

调节酶通常通过它们的动力学与米氏动力学的偏差而分辨出，速度对底物浓度所作的图可能为“S”型曲线或修饰的双曲线［图 9－7（a）］。如果以双倒数形式（Lineweaver-Burk）



(a) v_0 对 $[S]_0$ 作图：(1) S 型 (2) 双曲线 (3) 表观双曲线

(b) 同样数据的双倒数作图。

注意：只有（2）是线性的，并为双曲线动力学；而（1）为凹型，（3）为凸型。

图 9－7 调节酶的可能动力学表现

作图，所得曲线为非线性图［图 9－7（b）］。

一个比较调节酶的很有用的参数为比例 R_s：

$$R_s = \text{在最大速度 90\% 时的底物浓度/在最大速度 10\% 时的底物浓度} \qquad (9.44)$$

对米氏酶而言，$R_s = 81$。对一个“S”型曲线，$R_s < 81$ 并且酶与底物表现正协同性。正协同性指底物结合或催化速率或二者共同随着底物浓度的提高而提高，这比一个简单的米氏酶提高更多。如果 $R_s > 81$，酶与底物表现为负协同性。当底物浓度提高时，与一个米氏酶浓度提高时相比，底物结合或催化效率提高较少。

例 9.9

同促和异促效应均能作用于结合蛋白。最好的例子就是血红蛋白与 O_2 的结合。一分子的 O_2 结合到血红蛋白上，与下一分子 O_2 的结合为正向协同，所以当 O_2 的饱和度提高，血红蛋白对 O_2 的亲和力就明显提高。当以部分饱和度对 O_2 分压（相当于 O_2 浓度）作图，得到的曲线不是双曲线而是“S”型曲线（图 9－8）。

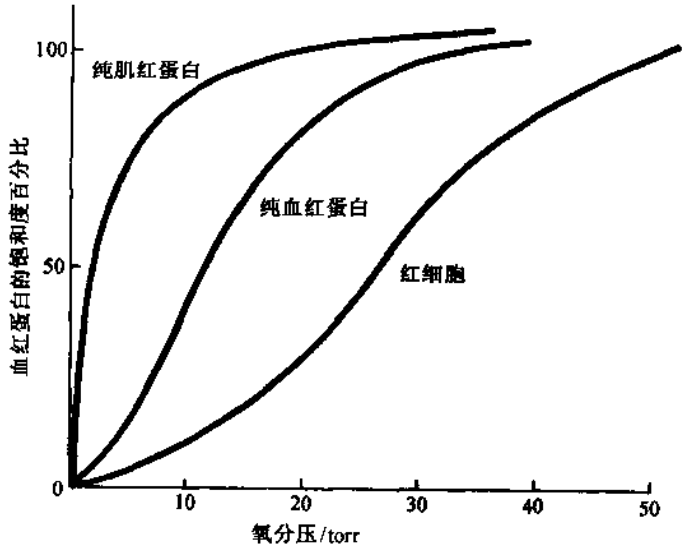


图 9－8　血红蛋白和肌红蛋白的氧结合曲线

人体红细胞中，异促效应物 2，3－二磷酸甘油酸（BPG）降低了血红蛋白四聚体的全部四个结合位点对 O_2 的亲和力（第 5 章）。另一方面，肌肉的 O_2－结合蛋白——肌红蛋白是一个单亚基蛋白质，并不表现“S”型 O_2 结合行为，也不受 BPG 的影响。

协同性的数学模型

尽管血红蛋白不是一个酶，而是一个 O_2－结合蛋白，但它的研究对于我们了解分子协同性有很大帮助。血红蛋白的协同 O_2－结合行为是于 1903 年由 Bohr 提出的，比酶的协同效应早很多。他为了解释这种效应作了许多努力。因此，这是一个我们值得注意的早期理论，即使在今天它还有重大意义。

Hill 方程式

1909 年，A. V. Hill 提出了血红蛋白（Hb）和氧的结合可以通过反应分子数 $n+1$ 描述：

$$Hb + nO_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_n$$

其中 n 为血红蛋白分子上的 O_2－结合位点的数目。对部分饱和度 Y（在任何情况下结合位点被 O_2 占用的比例）的方程式为（问题 5.21），

$$Y = \frac{K_b(pO_2)^n}{1 + K_b(pO_2)^n} \tag{9.45}$$

其中 pO_2 为氧分压（托），K_b 是联合结合常数，定义为

$$K_b = \frac{[Hb(O_2)_n]}{[Hb](pO_2)^n} \tag{9.46}$$

注意 Y 是一个无量纲量，在 0～1 之间变化；n 为 Hill 系数。n 的值大约为 2.5，Hill 方程为一条类似于图 9-8 的“S”型曲线。n 不是一个整数的事实在 Hill 方程的数据分析和机制表达方面产生了一些早期的问题。这样的问题导致了其他机制模型的发展。

例 9.10

如果 Hill 方程式中 $n=1$，方程式将成为什么形式？

当 $n=1$ 时，方程式 (9.45) 为矩形双曲线。回想米氏表达式中，K_m 相当于（单位等于）一个解离常数，而像 Hill 方程式这样的结合方程式，通常写为缔合常数（其数值为相应的解离常数的倒数）。

问题：有可能从实验数据确定 Hill 方程的 K_b 和 n 值吗？

重新整理方程式 (9.46)，同时将两边取对数，我们得到

$$\lg\left(\frac{Hb(O_2)_n}{[Hb]}\right) = \lg K_b + n\lg K_b + n\lg(pO_2) \tag{9.47}$$

或，一种应用蛋白与底物 S 结合的部分饱和度 Y 的更普通的方程式为

$$\lg\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = \lg K_b + n\lg[S]_0 \tag{9.48}$$

以方程式 (9.48) 的左手边对 $\lg[S]_0$ 所作的图即称为 Hill 图，从图的斜率可以估计出 n，以截距可估计出 K_b。

例 9.11

对一个酶反应而言（与结合反应相反），初始速度 v_0 由酶底物复合物的浓度决定，这时，方程式 (9.48) 为什么形式？

部分饱和度的单位对应于 V_{max}，因此由 $\lg(v_0/V_{max}-v_0)$ 对 $\lg[S]_0$ 作图可得到 Hill 图。很显然，在应用这种方法分析数据前，必须得到 V_{max} 的初始估计值。

Adair 方程

1925 年，G. S. Adair 推断血红蛋白的分子质量大约是先前估计的四倍。他假定血红蛋白有四个 O_2-结合位点，分四步被填充，如下所示：

$$Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$$
$$HbO_2 + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_2$$
$$Hb(O_2)_2 + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_3$$
$$Hb(O_2)_3 + O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4$$

假设一个结合位点位于一个完全空（没有位点被填充）的血红蛋白分子上，那么这个位点的结合反应可通过缔合平衡常数 $K_1 = k_1/k_{-1}$ 而定性，其中 k_1 和 k_{-1} 分别为正反应和逆反应的单一速率常数。因为这个常数仅指一个位点，所以被称为内部常数。总体或外部结合常数与所有四个结合位点相关，因此有 $4K_1$ 值。针对其他三个位点的外部结合常数也可用内部结合常数和它们所谓的统计因子 $3/2K_2$、$2/3K_3$ 和 $1/4K_4$ 来表示。因此，四个位点的

Adair 结合函数 Y 可表达为：

$$Y = \frac{\text{被填充的结合位点的数量(或摩尔浓度)}}{\text{结合位点的总量(或摩尔浓度)}} \tag{9.49}$$

$$= \frac{K_1[X] + 3K_1K_2[X]^2 + 3K_1K_2K_3[X]^3 + K_1K_2K_3K_4[X]^4}{1 + 4K_1[X] + 6K_1K_2[X]^2 + 4K_1K_2K_3[X]^3 + K_1K_2K_3K_4[X]^4} \tag{9.50}$$

其中在血红蛋白结合的特殊情况下，$[X] = pO_2$。

例 9.12

估计内部结合常数也可通过如下所示的另一种方法。实验测量一个聚合蛋白或酶的每个位点的结合常数将依赖于每一个分子有效位点的数目，如，血红蛋白四聚体的第一个结合反应为

$$Hb + O_2 \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} HbO_2$$

血红蛋白有四个位点可以结合 O_2，但结合的 O_2 只能从其中一个位点上解离。因此，根据质量作用定律，(全部) 外部平衡常数等于 $4k_1/k_{-1} = 4K_1$。与之相似，K_2^e所代表的外部常数等于 $3/2K_2$，K_2 为内部常数。因为相同的原因，$K_3^e = 2/3K_3$ 和 $K_4^e = 1/4K_4$。

问题：如果血红蛋白四聚体有四个完全相同的没有相互作用的结合位点，内部结合常数的相对值为多少？

它们全部相等，即 $K_1 = K_2 = K_3 = K_4$。因此，在这种情况下位点之间没有协同性 (见例 9.13)。如果每一个结合步骤促进了下一个步骤的进行，即 $K_1 < K_2 < K_3 < K_4$ 时，那么将存在正协同性。很明显，K 之间的更多复杂关系可能存在，如 $K_1 > K_2 < K_3 < K_4$。

例 9.13

证明如果 $K_1 = K_2 = K_3 = K_4$ 时，四个位点的 Adair 方程式将变为一条矩形双曲线。

注意四个位点的 Adair 方程以及普通的 n 位点方程式的分子和分母中的统计因子，它们是二项式展开的系数，即 $(1 - x)^n$ 展开的系数。在 $n = 4$ 的现有情况下，应用方程式 (9.50) 得到

$$Y = \frac{K_1[X] + 3K_1^2[X]^2 + 3K_1^3[X]^3 + K_1^4[X]^4}{1 + 4K_1[X] + 6K_1^2[X]^2 + 4K_1^3[X]^3 + K_1^4[X]^4} \tag{9.51}$$

$$= \frac{K_1[X](1 + K_1[X])^3}{(1 + K_1[X])^4} = \frac{K_1[X]}{1 + K_1[X]} \tag{9.52}$$

最后的表达式为双曲线，很显然，当 K_1 为缔合常数时，方程式等于米氏表达式。

有关同促效应的 Monod、Wyman 和 Changeux (MWC) 模型

血红蛋白结合 O_2 的协同性和许多酶的变构效应需要在空间上相隔较远的位点之间具有相互作用。MWC 模型于 1965 年提出，它主要为了在有关酶协同性的解释中将变构和构象效应结合起来。初部观察表明大多数协同蛋白的每个分子 (寡聚体) 都含有几个完全相同的亚基 (原聚体)，这样的状态对结合的协同性是必要的。MWC 模型的定义如下：

1. 每一个原聚体均以两种构象中的一种存在，两种构象分别以 R 和 T 表示。它们最初是指松弛构象和紧张构象，后者没有催化活性。
2. 一个寡聚体的所有亚基必须为相同的构象，因此，对于一个四聚体蛋白质，仅有构象态 R_4 和 T_4 是允许的，如 R_3T 这样的混合态是禁止的。换句话说，共同的 (或一起的) 转变发生于 R_4 到 T_4 的转化过程中，反之亦然。

3. 蛋白质的两个状态处于平衡，并不受配体是否结合的影响。对一个四聚体而言，平衡常数为

$$L = [T_4]/[R_4] \tag{9.53}$$

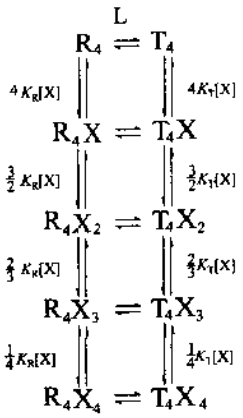
4. 配体分子可结合到一个亚基的任何一个构象，但缔合常数不同。对于每一个 R 亚基

$$K_R = [RX]/[R][X] \tag{9.54}$$

对于每一个 T 亚基

$$K_T = [TX]/[T][X] \tag{9.55}$$

这些基本条件反应出蛋白质和配体（X）的下列多种平衡模式：



10 种形式蛋白质的浓度可用下列平衡表达式表示，其中 c 为比值 K_T/K_R。

$$\begin{aligned}
&[R_4X] = 4K_R[R_4][X]\\
&[R_4X_2] = 3/2K_R[R_4][X] = 6K_R^2[R_4][X]^2\\
&[R_4X_3] = 2/3K_R[R_4X_2][X] = 4K_R^3[R_4][X]^3\\
&[R_4X_4] = 1/4K_R[R_4X_3][X] = K_R^4[R_4][X]^4\\
&[T_4] = L[R_4]\\
&[T_4X] = 4K_T[T_4][X] = 4LcK_R[R_4][X]\\
&[T_4X_2] = 6K_T^2[T_4][X]^2 = 6Lc^2K_R^2[R_4][X]^2\\
&[T_4X_3] = 4K_T^3[T_4][X]^3 = 4Lc^3K_R^3[R_4][X]^3\\
&[T_4X_4] = K_T^4[T_4][X]^4 = Lc^4K_R^4[R_4][X]^4
\end{aligned} \tag{9.56}$$

统计因子 4、3/2 等又一次出现，因为 K_R 和 K_T 为内部缔合常数，而复合物的完整表达式需要还外部参数。如 $K_R = [RX]/[R][X] = 3/2[R_4X_2]/[R_4X][X]$，因为 R_4X 分子有三个、R_4X_2 分子有两个未填充位点（见例 9.12）。部分饱和度 Y 可通过方程式（9.49）重新定义为：

$$Y = \frac{[R_4X] + 2[R_4X_2] + 3[R_4X_3] + 4[R_4X_4] + [T_4X] + 2[T_4X_2] + 3[T_4X_3] + 4[T_4X_4]}{4([R_4] + [R_4X] + [R_4X_2] + [R_4X_3] + [R_4X_4] + [T_4] + [T_4X] + [T_4X_2] + [T_4X_3] + [T_4X_4])} \tag{9.57}$$

$$= \frac{(1 + K_R[X]^3)K_R[X] + Lc(1 + cK_R[X])^3K_R[X]}{(1 + K_R[X])^4 + L(1 + cK_R[X])^4} \tag{9.58}$$

当 $K_R[X] = \alpha$ 时，一般的 n 位点 MWC 模型为

$$Y = \frac{\alpha(1 + \alpha)^{n-1} + Lc\alpha(1 + c\alpha)^{n-1}}{(1 + \alpha)^n + L(1 + c\alpha)^n} \tag{9.59}$$

这个表达式关于参数值在各种变化范围的动态变化请见图 9-9。

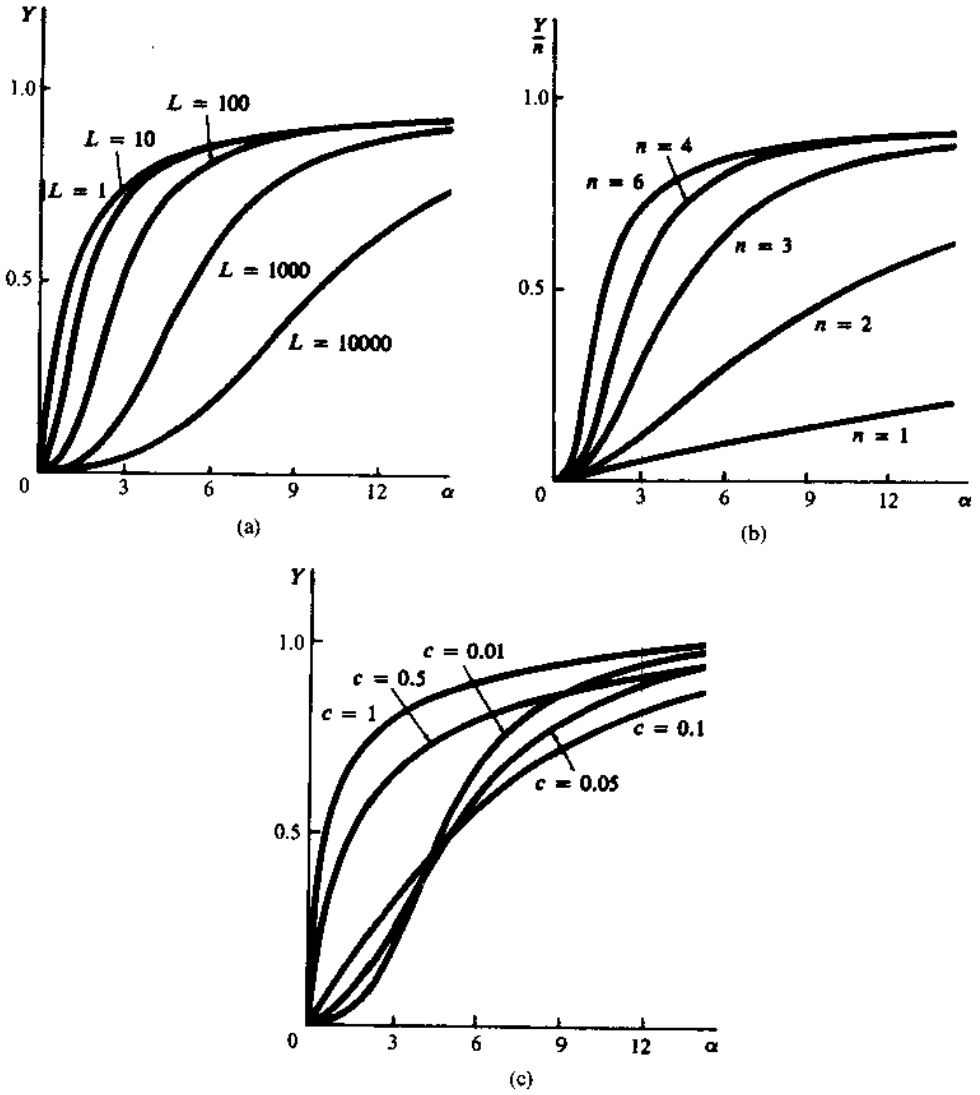


图 9-9　MWC 方程式（9.59）描述的结合曲线。(a) 当 $n=4$ 和 $c=0.01$ 时，异构化常数（L）值的变化效应。(b) 当 $L=100$ 和 $c=0.01$ 时，结合位点（n）数目的变化效应。(c) 当 $L=1\,000$ 和 $n=4$ 时，K_T/K_R 比率 c 的变化效应

例 9.14

由方程式（9.59）决定的饱和度曲线的形状依赖于 L 和 c 的值。如果 $L=0$，蛋白质的 T 形式将不存在，$Y=K_R[X]/(1+K_R[X])$。这是一个双曲线结合函数。如果 $L=\infty$，则 $Y=K_T[X]/(1+K_T[X])$。因此，双曲线结合曲线的偏离仅发生于 R 和 T 形式共同存在的情况下，否则，例 9.13 的 Adair 方程式所描述的情况将适用，因为每一个位点的结合是独立并完全相等的。

例 9.15

除非 $c=0$，并不能明确方程式（9.59）或（9.58）为“S”曲线。$n=4$ 的情况下

$$Y=\frac{(1+K_R[X])^3K_R[X]}{L+(1+K_R[X])^4} \tag{9.60}$$

因此，当 [X] 很大并且 $K_R[X]>L$，L 就可忽略不计，$Y=\dfrac{K_R[X]}{1+K_R[X]}$ 即结果为双曲线结合方程式。当 [X] 值很低，L 代表分母，当 [X] $\to 0$ 时，结合曲线的斜率接近于

$\frac{K_R}{(L+1)}$，与双曲线的斜率相反，它接近于 K_R。以符号表示即

$$\lim_{[X]\to 0}\frac{dY}{d[X]}=\frac{K_R}{(L+1)} \tag{9.61}$$

当 L 远远大于 1 时，这条曲线肯定为“S”型曲线。当 L 无限大时，曲线的初始斜率为 0。

异促效应的 MWC 模型

前一部分的 MWC 模型只解释了同促效应，例如，血红蛋白结合 O_2，但异促效应经常在调节酶中观察到。为了将这些效应与 MWC 模型结合，我们必须介绍第二个配体与 R 态或 T 态（或与二者同时）的结合。

我们考虑一个简化的模型，假设底物 X（配体）只与 R 态结合。与另一个配体 A 的结合将使酶活化，这样肯定促进了平衡在 R 态和 T 态之间改变，使平衡更偏向于 R 态。因此一个激活剂肯定与 R 态结合，同样的原因，一个抑制剂肯定与 T 态结合，从而导致酶向非激活状态变化。与前一部分应用相似的多平衡分析，可以得到 Y 的表达式：

$$Y=\frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n+[L(1+\beta)^n/(1+\gamma)^n]} \tag{9.62}$$

其中 $\alpha=K_R[X]$，$\beta=K_I[I]$，$\gamma=K_A[A]$ 和 $L=[T_n]/[R_n]$。$L(1+\beta)^n/(1+\gamma)^n$ 被认为是变构系数，当它为 0 时，方程式（9.62）恢复到一个双曲线结合函数。很显然，如果激活剂项 γ 上升，变构系数将下降，因此，就使函数变得更加趋于双曲线形（见例 9.15）。而抑制剂浓度提高，将提高抑制作用项（β），因此变构系数也将提高，这样就使曲线更加“S”形。上述效应请见图 9－10。

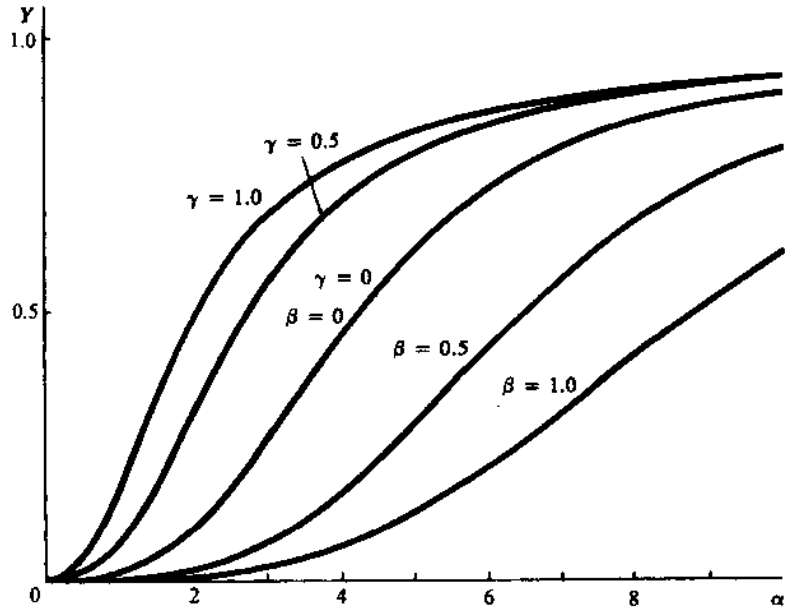


图 9－10 当正和负异促效应物存在时，一个 MWC 变构酶的动态变化。方程式（9.62）中的激活剂 γ 导致双曲线变得更加弯曲，而抑制剂（β）使曲线更加“S”型。上图是当 $L=1\,000$ 和 $n=4$ 时，由方程式（9.62）所得的曲线

Koshland、Nemethy 和 Filmer 模型（KNF 模型）

MWC 模型在描述一个寡聚蛋白质负协同同促效应和异促效应的结合函数的失败使 Koshland 等人（1966 年）发展了一个关于协同性的更普通的模型。1958 年 Koshland 的关于

酶专一性的诱导契合假说扩展了 Fischer 的锁匙概念。Koshland 认为底物结合到酶上引起所催化的反应基团正确的三维排列。这个抽象的概念在关于寡聚协同酶的 KNF 模型中得以扩展，在这种情况下，构象的变化通过底物结合到一个原聚体（亚基）上而被诱导（与之相反，MWC 模型认为无论底物结合与否，亚基之间的平衡均存在）。原聚体中的构象变化被传输到相邻的原聚体上以影响它们的结合和催化性质。这个基本思想能同时解释负协同性和正协同性。但是，这个模型的细节这里不再讨论。

问题解答

导言和定义

9.1 应用质量作用的原则写出下列反应速率的表达式：

(a) $A \xrightarrow{k_1} P$

(b) $A \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P$

(c) $A + B \xrightarrow{k_1} P$

(d) $A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P$

(e) $A + B \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} P + Q + R$

答：

(a) $\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] \qquad \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}$

(b) $\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] + k_{-1}[P] \qquad \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}$

(c) $\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -k_1[A][B] \qquad \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}$

(d) $\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[P] \qquad \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}$

(e) $\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt} = -k_1[A][B] + k_{-1}[P][Q][R]$

$\frac{d[P]}{dt} = \frac{d[Q]}{dt} = \frac{d[R]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt}$

9.2 问题 9.1 中每一个反应的动力学级数是什么？

答：

反应 (a) 和 (b) 是一级，其中 (b) 的两个方向均是；反应 (c) 和 (d) 的正向反应 (从左到右) 为二级，(d) 的逆向反应为一级；(e) 的正向反应为二级，而逆向反应为三级。

注：对于非催化反应，所给定的反应分子数和级数一样。但是，一个三分子的反应，就像 (e) 那样的反应是不太可能发生的。更经常发生的是两个反应物之间相互作用后再与第三个反应物发生反应。这在顺序上相当于两个二级反应。

9.3 问题 9.1 中各反应模式速率常数的单位是什么？

答：

(a) k_1: s^{-1}；(b) k_1 和 k_{-1}: s^{-1}；(c) k_1: $mol^{-1}Ls^{-1}$；(d) k_1: $mol^{-1}Ls^{-1}$，和 k_{-1}: s^{-1}；(e) k_1: $mol^{-1}Ls^{-1}$，和 k_{-1}: $mol^{-2}L^2s^{-1}$。

9.4 表 9.2 中的数据由一个反应的速率得到，这个反应的化学计量为 $aA + bB \rightarrow pP$；其速率是由不同浓度的 A 和 B 决定。请确定反应的级数，即估计 a 和 b 的值。

答：

反应的级数是一个由实验确定的参数，得到它最简单的方法为测定一个反应物浓度变化的初始反应速率。

接着以一个反应物的lg（速率）对lg（浓度）作图，如果控制其他反应物为常量，就得到一条斜率等于级数的直线。如果所有反应物的浓度以固定比例变化，那么所得直线斜率为整体反应级数。如果只有一个反应物浓度变化，级数就仅指这个反应物的级数。因此，应用表9.2的数据，以lg（对角线单元）对lg（浓度）所作的图见图9-11（a）。

表9.2 反应级数数据：v_0/（mmolL^{-1}s^{-1}）

		$[A]_0$/（mmolL^{-1}）			
		10	20	50	100
$[B]_0$ / （mmolL^{-1}）	10	1.2	2.0	2.8	3.9
	20	2.6	4.0	5.9	7.9
	50	6.5	8.8	14.5	19.8
	100	12.5	17.9	29.0	40.5

图9-11（a）的斜率为1.5，它为整体反应的级数。[图9-11（b）和（c）]为四个级数的一系列图，它们分别是从变化的$[A]_0$和固定的$[B]_0$及相反的情况下而得到的。从这些图的斜率，我们可以看出A的级数a等于1/2，B的级数b等于1。

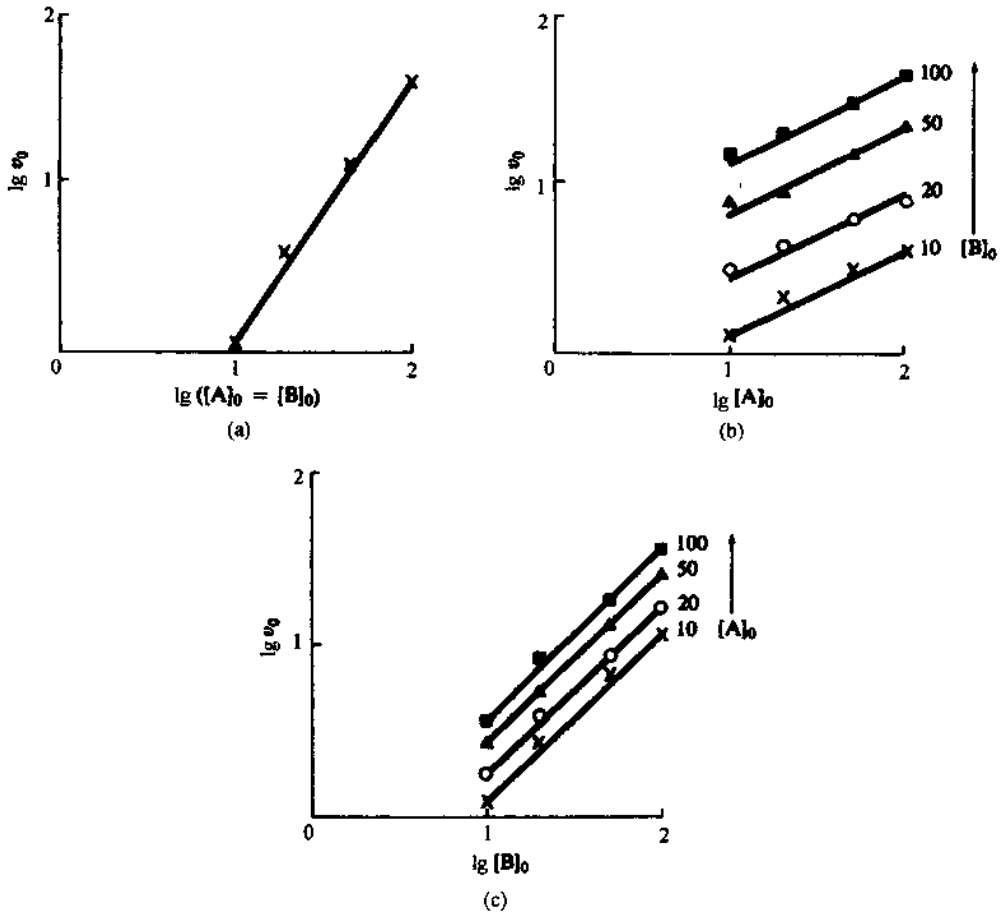


图9-11 反应级数图

酶反应速率依赖于底物浓度

9.5　应用米氏方程完成酶动力学数据集合；K_m 已知为 1mmolL^{-1}。

$[S]_0$/ (mmolL^{-1})	v_0/ (μmolL^{-1}min^{-1})
0.5	50
1.0	-
2.0	-
3.0	-
10.0	-

答：

应用方程式（9.5）和表中的第一项得到 V_{max} = 150mmolL^{-1}min^{-1}。其他结果就可简单地将 $[S]_0$ 值带入方程式（9.5）中，结果请见下。

$[S]_0$/ (mmolL^{-1})	v_0/ (μmolL^{-1}min^{-1})
0.5	50
1.0	75
2.0	100
3.0	112.5
10.0	136.4

9.6　己糖激酶在ATP存在的条件下，催化葡萄糖和果糖的磷酸化作用。但葡萄糖的 K_m 为 0.13mmolL^{-1}，而果糖的为 1.3mmolL^{-1}。假设葡萄糖和果糖的 V_{max} 一样，并且己糖激酶展现了双曲线动力学［方程式（9.5)］。（a）当底物 $[S]_0$ 分别为 0.13、1.3 和 13.0mmolL^{-1}时标准化的反应初始速度（即 v_0/V_{max}）。(b) 己糖激酶对哪一个底物的亲和力更大？

答：

(a) 葡萄糖的 v_0/V_{max} 值分别为 0.5、0.91 和 0.99；果糖的分别为 0.091、0.5 和 0.91。

(b) 葡萄糖。当在低浓度时，反应速率的 V_{max} 比果糖大。

K_m 和 V_{max} 的图解求值

9.7　一个固定量的酶溶液加到含有不同底物浓度的一系列反应混合物中，初始速率可通过产物生成的进行曲线的初始斜率得到。表 9.3 为取得的数据：

表 9.3　稳态酶动力学数据

$[S]_0$/ (mmolL^{-1})	v_0/ (mmolL^{-1}min^{-1})
0.1	0.27
2.0	5.0
10.0	20
20.0	40
40.0	64
60.0	80
100.0	100
200.0	120
1 000.0	150
2 000.0	155

(a) 酶反应混合物的 V_{max}为多少?

(b) 对底物的酶的 K_m 为多少?

答:

我们可以应用 Lineweaver-Burk 方程。在此，表 9.3 中的变量的倒数肯定可以计算出，并且能够作成图 9-12 那样的图。(忽略图 9-12 中的星号，它们针对问题 9.9。) (a) 从倒数图的纵坐标的截距可得到 $V_{max}=160\text{mmolL}^{-1}\text{min}^{-1}$。(b) 从倒数图的横坐标截距可得到 $K_m=60\mu\text{molL}^{-1}$。

9.8 为酶动力学实验设计的关键因素之一就是选择正确的底物浓度。在图 9-12 的基础上，底物浓度的最适变化范围是多少?

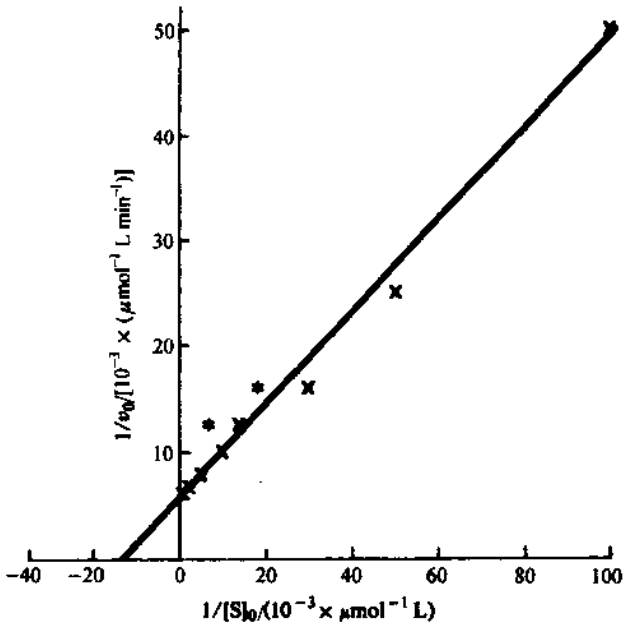


图 9-12 除了前两对数据外表 9.3 中其他数据的 Linweaver-Burk 图
(星号指问题 9.9)

答:

最有用的浓度是在 K_m 周围的浓度。事实上，粗略地估计，有用的浓度在 1/5 到 $5K_m$ 范围，在这个范围，v_0 将在 0.17 到 0.83 倍的 V_{max}之间变化。换句话说，v_0 在最高浓度比在最低浓度高 5 倍。如果初始浓度很低，速度的估计就不太准确，因为当 $t=0$ 时，反应进行曲线时非线性的。

9.9 对于问题 9.7 中描述的酶动力学实验，得到两个其他的数据对：($[S]_0=50\mu\text{molL}^{-1}$, $v_0=60\mu\text{molL}^{-1}\text{min}^{-1}$) 和 ($[S]_0=150\mu\text{molL}^{-1}$, $v_0=80\mu\text{molL}^{-1}\text{min}^{-1}$)。以整个数据集画一个 Lineweaver-Burk 图。与问题 9.7 的结果不同，现在的 K_m 和 V_{max}估计为多少?

答:

图 9-12 中以星号代表的点为新点。它们使 V_{max}和 K_m 的估计值更小，分别大约为 $25\mu\text{molL}^{-1}\text{min}^{-1}$和 $10\mu\text{molL}^{-1}\text{min}^{-1}$。

酶抑制

9.10 对一个单一底物酶促反应的抑制剂 I 的影响进行研究并得到以下结果:

底物浓度 $[S]_0$/ ($mmolL^{-1}$)	抑制剂浓度/ ($mmolL^{-1}$)		
	0	0.5	1.0
	反应速率 v_0/ ($mmolL^{-1}min^{-1}$)		
0.05	0.33	0.20	0.14
0.10	0.50	0.33	0.25
0.20	0.67	0.50	0.40
0.40	0.80	0.67	0.57
0.50	0.83	0.71	0.63

(a) 抑制剂作用的模型是什么？(b) 估算 V_{max}和 K_m 的值及反应的抑制常数。

答：

(a) 推断出抑制剂作用模型的最简单的方法是对每一个抑制剂浓度（图 9－13）的 $1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 作图。

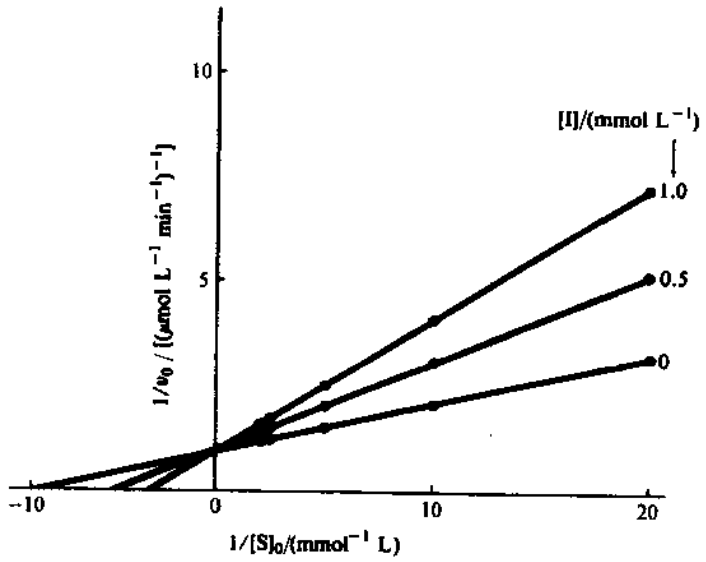


图 9－13　抑制效应的 Lineweaver-Burk 图

针对单纯的竞争性抑制的方程式（9.40）预测出 Lineweaver-Burk 图的斜率将随抑制剂浓度的变化而变化，但 $1/v_0$ 轴的截距（$1/V_{max}$）并不变化。因此，上述数据与抑制剂（I）作为单纯的竞争性抑制剂一致。

(b) 从 $1/v_0$ 轴的截距，可以估计出 V_{max}。我们从上面的方程式注意到图的斜率（SI）为

$$SI = \frac{K_m}{V_{max}}\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

因此，当将斜率作为［I］的函数作图，我们的到了图 9－14 的结果。

第二个图上的横坐标的截距为 $-K_I$；因此 K_I 可被估计为 $0.5mmolL^{-1}$。纵坐标的截距为 K_m/V_{max}，因为 V_{max}已知，所以 K_m 可以估计为 $0.1mmolL^{-1}$。

9.11　针对表 9.1 的酶抑制作用的四种类型，推导 Lineweaver-Burk 方程式并画出原型图。

答：

为了得到 Lineweaver-Burk 方程式，我们通过简单地将表 9.1 中 v_0 作为 $[S]_0$ 的函数

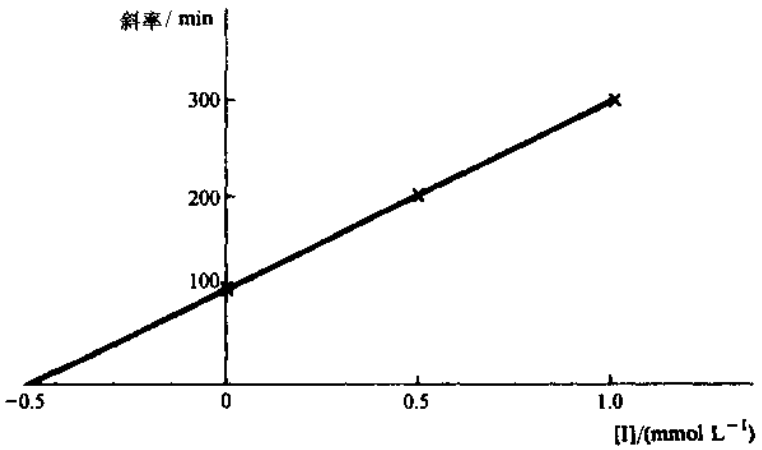


图 9-14

的方程式两边同时取倒数而进行。相应的 $1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 作图，当 [I] 变化时，图的斜率或截距或二者同时发生变化。单纯的非竞争性抑制显示直线在横坐标上相交。竞争性抑制的直线在纵坐标上相交。反或对竞争性抑制的直线相平行。对混合抑制而言，当 [I] 值不同时，斜率和轴的截距均不同。见图 9-15。

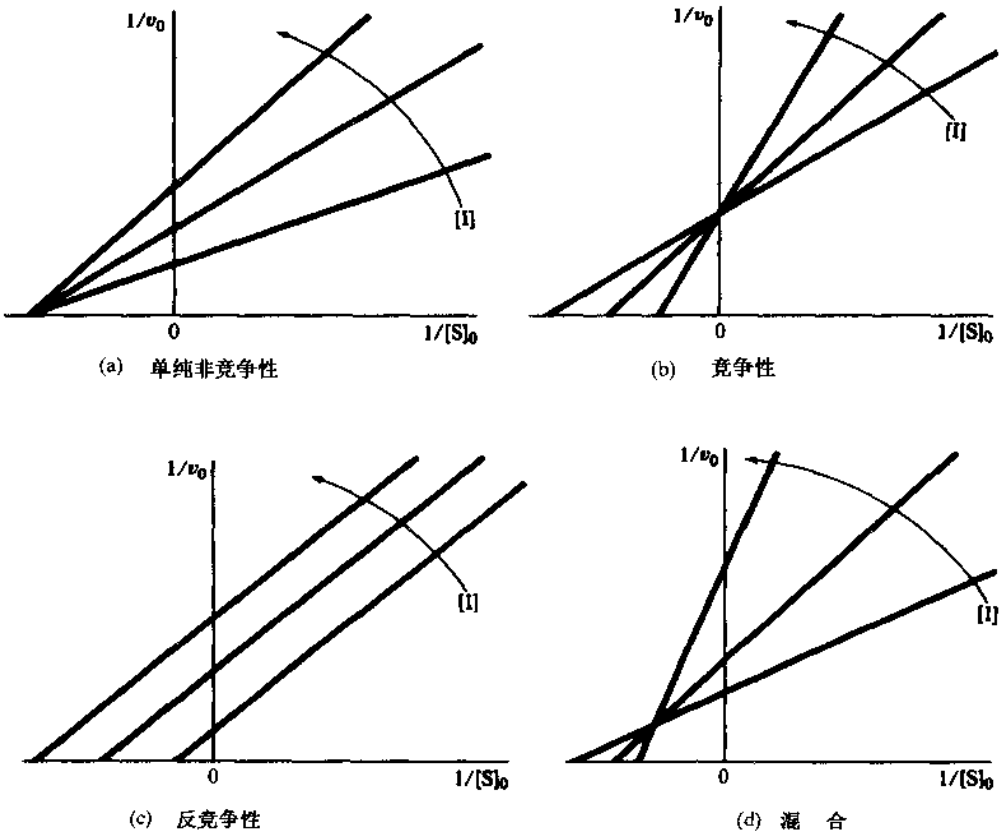


图 9-15 各种类型酶抑制剂的 Lineweaver-Burk 图。箭头方向为 [I] 增加的方向

9.12 假设顺序的 Bi Bi 反应为（例 9.6）：

$$A + B \rightleftharpoons P + Q$$

当 A 的浓度变化并 P 或 Q 是抑制剂时，指出将获得的抑制作用模式。

答：

我们有四种情况考虑。不同抑制剂浓度及下列条件的影响为：

(1) [A] 变化；[B] 确定，不饱和；P 为抑制剂

(2) [A] 变化；[B] 确定，饱和；P 为抑制剂

(3) [A] 变化；[B] 确定，不饱和；Q 为抑制剂

(4) [A] 变化；[B] 确定，饱和；Q 为抑制剂

在各种抑制剂浓度情况下，按照 $1/v_0$ 对 $1/[\text{底物}]_0$ 所作的图就能够很方便考虑抑制模型。变化的抑制剂也许只能影响竞争性抑制图的斜率、

非竞争性或混合抑制的斜率和截距或反竞争性抑制的截距。抑制模型可从下述所谓的 Cleland 规则预测：

(a) 当抑制剂和变化的底物结合到相同形式的酶，或不同形式的酶但相互之间平衡，在这样的情况下，可获得竞争性抑制。

(b) 当抑制剂和变化的底物结合到不同形式的酶上，这些酶通过可逆互变的形式而连接，这种情况下可得到非竞争性抑制或混合抑制。

(c) 当抑制剂和底物结合到不同形式的酶上，这些酶通过不可逆互变的形式而连接，这种情况下，可获得对或反竞争性抑制。

上述反应的全部可写为：

$$E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1 A}{\rightleftharpoons}} EA \underset{k_{-2}}{\overset{k_2 B}{\rightleftharpoons}} \left\{ \begin{matrix} EAB \\ EPQ \end{matrix} \right\} \underset{k_{-3}P}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} EQ \underset{k_{-4}Q}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} E$$

情况 1（变化的 [A]、不饱和 [B]、P 为抑制剂）：从上面原则的 (b) 可知，当 A 和 P 结合到不同形式的酶上（分别为 E 和 EQ），而酶以可逆互变形式连接，获得的为非竞争性或混合抑制。

情况 2（变化的 [A]、饱和 [B]、P 为抑制剂）：在这种情况下，E 和 EQ 的连接不可逆（因为 B 现在处于饱和水平）；因此，从上面原则的 (c) 可知，将获得的为反竞争性抑制。

情况 3（变化的 [A]、不饱和 [B]、Q 为抑制剂）：A 和 Q 均与酶的相同形式 (E) 结合；因此，从上面原则的 (a) 可知，获得的为竞争性抑制。

情况 4（变化的 [A]、饱和 [B]、Q 为抑制剂）：尽管 EA 和 EAB 的相互作用不可逆，但当 [B] 饱和时将 EAB 形成的方向进行，而 A 和 Q 仍与酶的相同形式结合；因此，从上面原则的 (a) 可知，获得的为竞争性抑制。

在酶促反应中建立抑制模型通常是阐明反应机制的重要步骤。这些数据表达中的一个复杂情况是可能形成死端复合物（即上述模型中 EAP 复合物的形成）。这在快速平衡反应中特别重要 [除重要的异构化步骤（上面例子中的 EAB 和 EPQ）外的其他所有步骤的速率常数均很大]。

pH 对酶反应速率的影响

9.13　假设酶对一个中性底物的水解有活性，其活性在一个很宽的 pH 范围即 pH6 到 pH8 不受影响。但是，对一个变换的含有咪唑基团的底物，它则显示出很窄的 pH 活性。当酶量不变，在 5 个不同 pH 值，使用了 10 个不同的底物浓度作了 50 个试验。对于每一个 pH，都给出了酶的线性 Lineweaver-Burk 图，并且所估计的 K_m 和 V_{max} 值如下所示：

pH	K_m/ (mmolL^{-1})	V_{max}/ (mmolL^{-1}min^{-1})
8.0	1.1	75
7.5	1.3	80
7.0	2.0	77
6.5	4.2	83
6.0	11.0	75

(a) 描述变化的 pH 对 K_m 和 V_{max}的影响。(b) 与不带电荷底物作用的酶的活性在 pH6～8 范围内很少随 pH 的变化而变化，其重要意义是什么？(c) 提出一个与上述结果一致的反应模型。(d) 计算 H^+-反应复合物的相关解离常数。

答：

(a) 从数据可明显看出，V_{max}不随 pH 变化的实验错误。相反，K_m 对 pH 是强依赖性的，在高 pH 下酶与底物有最高的亲和力。

(b) 如果酶促反应速率对 pH 不敏感，这说明缺乏离子化基团参与结合、催化或二者共同的过程。这就是有酶的情况。离子化底物反应速率依赖于 pH 的事实说明底物的离子化影响反应速率。

(c) 鉴于上述陈述，一个可能的反应模型为

$$\begin{array}{ccccc} S+E & \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} & ES & \xrightarrow{k_2} & E+P \\ \Big\| K_s & & & & \\ SH^+ & & & & \end{array}$$

(d) 相应的速率表达式为

$$\frac{1}{v_0}=\frac{V_{max}[S]_0}{K_m\left(1+\dfrac{[H^+]}{K_s}\right)+[S]_0}$$

在低 pH 时，这个方程式与方程式 (9.35) 形式相同，即方程式 (9.37)。我们看到 V_{max}不受 pH 的影响，但 $K_m^{app}=K_m\ (1+\ [H^+]\ /K_s)$。以表中的数据 K_m^{app} 对 $[H^+]$ 作图，其斜率为 K_m/K_s，截距为 K_m。因此，$K_s=10^{-7}$molL^{-1}，$K_m=1.0$mmolL^{-1}。见图 9－16。

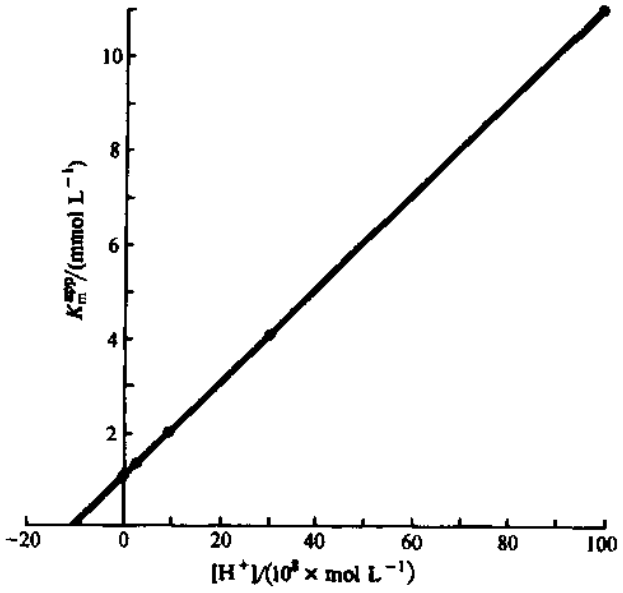


图 9－16

9.14　画出一个参与游离酶而非底物离子化的反应模型。推导与问题 9.13（d）相似的相应的速率方程式。

答：

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

$$K_e \Big\| \quad EH^+$$

方程式为

$$\frac{1}{v_0} = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m\left(1 + \frac{[H^+]}{K_e}\right) + [S]_0}$$

这个方程式在低 pH 时也与方程式（9.35）的形式相同，并且与上面的问题 9.13 的形式相同。因此，在 pH 依赖性的基础上不可能辨别现有模型（游离酶的离子化）和游离底物的离子化模型。

调节酶

9.15　图 9－17 的反应模型描述了细菌球形红假单胞菌从天冬氨酸（A）合成异亮氨酸（E）的反应模型。这种控制称为顺序反馈控制。请描述这个代谢控制体系的操作过程。

答：

E（异亮氨酸）的过量产生抑制了 E_6（苏氨酸脱氨酶），随后 D（苏氨酸）的上升降低了通过酶 3（高丝氨酸脱氢酶）生成的 C（高丝氨酸）的速率。B（天冬氨酸半醛）的浓度上升又反过来抑制了 E_1（天冬氨酸激酶）的作用。因此，很明显为什么将这个控制体系称为负反馈网络或顺序反馈体系。

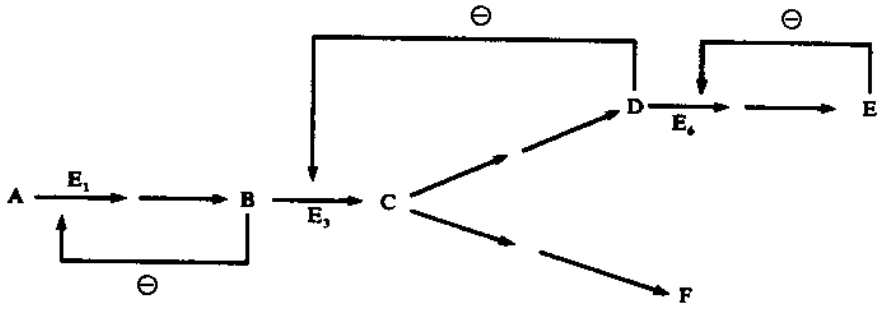


图 9－17

9.16　在肝脏中的磷酸果糖激酶中，ATP、ADP 和柠檬酸是反应速率的效应物（见图 9－18）。确定这些效应物的类型。

答：

1. ATP：负同促效应物

2. 柠檬酸：负异促效应物

3. ADP：正异促效应物

ATP 产生负反馈控制（与例 9.7 相反），而 ADP 产生正反馈控制。

9.17　描述分别表现与底物结合的协同性、非协同性和负协同性的酶的 $1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 曲线的形状。

答：

在 $1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 所作的图中，直线的斜率与 K_m 成正比。在正协同性的情况下，

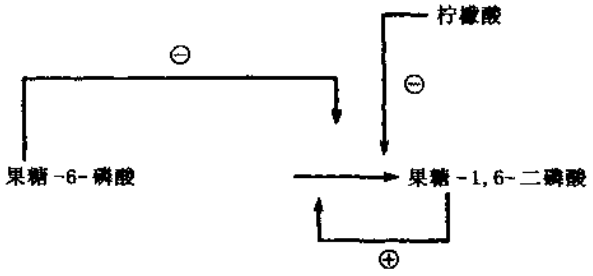


图 9-18

酶与底物的亲和力增加，因此，当 $[S]_0$ 上升（或 $1/[S]_0$）时，K_m 降低。因此，$1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 所作的图的斜率将随着 $1/[S]_0$ 的降低而降低[图 9-19(a)]。

在非协同性的情况下，酶对底物的亲和力及 K_m 随着 $[S]_0$ 的变化保持不变。因此，$1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 所作的图的斜率将保持恒定[图 9-19(b)]。

在负协同性的情况下，酶对底物的亲和力随着 $[S]_0$ 的提高而降低，因此，K_m 随 $[S]_0$ 的提高而提高。因此，$1/v_0$ 对 $1/[S]_0$ 所作的图的斜率将随 $1/[S]_0$ 的降低而提高。

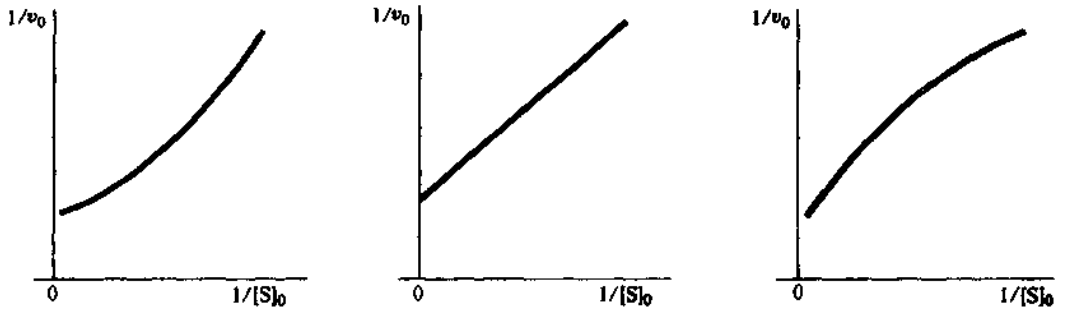


图 9-19

9.18 证明对于一个米氏酶，方程式（9.44）中的 R_s 等于 81。

答：

速率方程式为

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0}$$

如以 $[S]_0$ 表达，方程式变形为：

$$[S]_0 = \frac{v_0 K_m}{V_{max} - v_0}$$

$$R_s = \frac{0.9V_{max}K_m(V_{max} - 0.1V_{max})}{0.1V_{max}K_m(V_{max} - 0.9V_{max})} = \frac{(0.9)(0.9)}{(0.1)(0.1)} = 81$$

9.19 如果一个溶液含有等量的一个酶的两种同工酶（用凝胶电泳确定），而且它们的 k_{cat} 相等，但底物的 K_m 分别为 $1mmolL^{-1}$ 和 $0.1mmolL^{-1}$，请解释 Lineweaver-Burk 图的初始速度数据特征，这些数据是由 0.02 到 $5mmolL^{-1}$ 变化的九个底物浓度得到的。

答：

一个理想的数据集产生于这个表达式：

$$v_0 = \frac{1[S]_0}{1 + [S]_0} + \frac{1[S]_0}{0.1 + [S]_0}$$

其中 $[S]_0 = [0.02, \cdots, 5]\ \text{mmolL}^{-1}$，$V_{max} = 1$（任意单位）

$[S]_0$ / (mmolL^{-1})	$1/[S]_0$ / [(mmolL^{-1})$^{-1}$]	v_0 / (任意单位)	$1/v_0$ / [(任意单位)$^{-1}$]
0.020	50.0	0.19	5.3
0.025	40.0	0.22	4.5
0.04	25.0	0.32	3.1
0.10	10.0	0.59	1.7
0.20	5.0	0.83	1.2
0.50	2.0	1.17	0.85
1.00	1.0	1.41	0.71
2.00	0.5	1.63	0.61
5.0	0.2	1.82	0.55

Lineweaver-Burk 图显示于图 9－20。

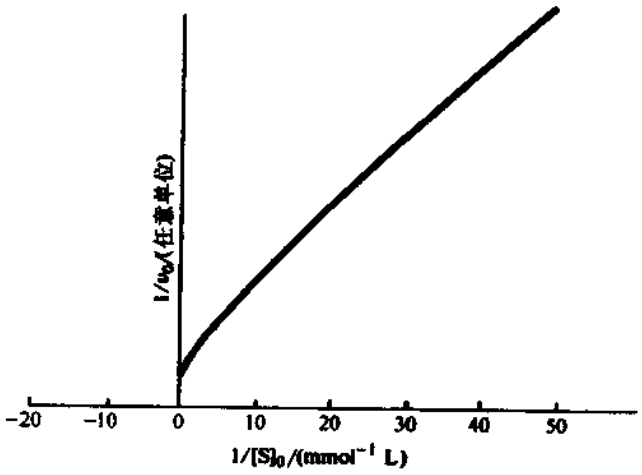


图 9－20　两个矩形双曲线之和的 Lineweave-Burk 图：$V_{max1} = V_{max2} = 1$，$K_{m1} = 1.0\text{mmolL}^{-1}$，$K_{m2} = 0.1\text{mmolL}^{-1}$。

注意图 9－20 的曲线从右向左向下弯曲。这与负协同性［见图 9－19 (c)］的效应相同。换句话说，这样的弯曲并非控制酶的特征，但能够简单地从一个同工酶的混合物中出现。

9.20　推导 Hill 方程式-方程 (9.45)。

答：

从方程式 (9.46) K_b 的定义看，血红蛋白－O_2 复合物的浓度为

$$[\text{Hb}(O_2)_n] = K_b[\text{Hb}](pO_2)^n$$

部分饱和度 Y 为

$$Y = \frac{\text{Hb}(O_2)_n \text{ 的浓度}}{\text{血红蛋白总浓度}} = \frac{K_b[\text{Hb}](pO_2)^n}{[\text{Hb}] + K_b(pO_2)^n}$$

将分子和分母同时消去［Hb］即产生了 Hill 方程式：

$$Y = \frac{K_b(pO_2)^n}{1 + K_b(pO_2)^n}$$

9.21 证明当 $n>1$ 时，Hill 方程式与一个正协同性结合或酶体系相一致。

答：

对于一个酶，将 Hill 方程式进行重新整理，得到

$$[S]_0 = \left(\frac{v_0 K_m}{V_{max} - v_0}\right)^{1/n}$$

从问题 9.18 已知 $R_s = (81)^{1/n}$。所以如果 $n>1$，则 $R_s<81$，按照 9.11 部分即在“调节酶的动力学行为”中的定义，酶为正协同性。

9.22 调节酶催化的反应初始速度由下列范围的初始浓度的底物决定：

$[S]_0$/ ($mmolL^{-1}$)	v_0/ ($mmolL^{-1}min^{-1}$)
0.1	1.6×10^{-4}
0.3	1.4×10^{-3}
0.5	4.0×10^{-3}
1.0	1.6×10^{-2}
3.0	0.14
5.0	0.39
10.0	1.45
100.0	14.6
500.0	15.9
1 000.0	16.0

确定 Hill 系数和表观 K_m。

答：

很显然，V_{max}为 16.0$mmolL^{-1}min^{-1}$，因为当 $[S]_0$ 为 500 和 1000$mmolL^{-1}$时的 v_0 很接近，因此，在这样高的底物浓度时酶几乎为饱和状态。如果我们假设 V_{max}就是这个值，并且应用例 9.11 的表达式，我们可以建立将 $[S]_0$ 以摩尔浓度表示的下表。当 $n=2$ 和 $K_m=1mmolL^{-1}$时，利用此表中的数据可得到图9－21，其斜率为 n，纵坐标的截距为 lg ($1/K_m$)。

$\lg\left(\frac{v_0}{V_{max}-v_0}\right)$	lg $[S]_0$
-5.00	-4.00
-4.06	-3.52
-3.60	-3.30
-3.00	-3.00
-2.05	-2.52
-1.60	-2.30
-1.00	-2.00
+1.02	-1.00
+2.20	-0.30
-	0.00

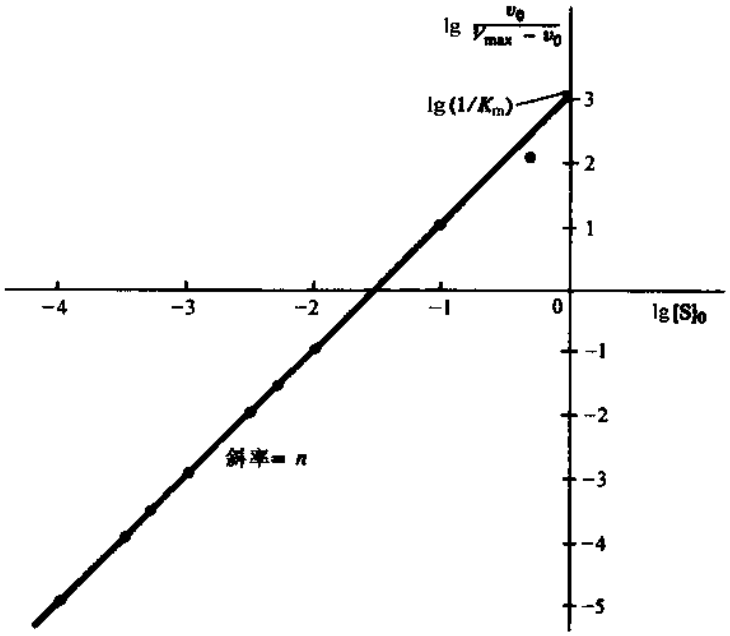


图 9－21

9.23　当内部结合常数 $K_T/K_R = c$ 等于 1 时，MWC 方程式（9.59）将为什么形式？

答：

方程式变为

$$Y = \frac{\alpha(1+\alpha)^{n-1} + L\alpha(1+\alpha)^{n-1}}{(1+\alpha)^n + L(1+\alpha)^n}$$

将分子和分母分别提取公因式 $(1+\alpha)^{n-1}$和 $(1+\alpha)^n$，我们得到

$$Y = \frac{\alpha(1+L)(1+\alpha)^{n-1}}{(1+L)(1+\alpha)^n} = \frac{\alpha}{1+\alpha} = \frac{K_R[X]}{1+K_R[X]}$$

因此，这是第三种形式，这个特殊的模型简化到一个简单的双曲线表达式；其他两种情况在例 9.14 中已讨论。这个结果完全“合理”，因为如果配体与两种状态结合完全一样，各种状态的相对量与结合行为不相关。

补充问题

9.24　除 Lineweaver-Burk 方程式之外，米氏方程经代数变换后均能以酶动力学数据产生直线图。Eadie 和 Hofstee 即得到这样一个图，他们的方程式为以下形式：

$$v_0 = -K_m\frac{v_0}{[S]_0} + V_{max}$$

推导这个方程式。

9.25　一个 Eadie-Hofstee 图的纵坐标为 v_0 值，横坐标为 $v_0/[S]_0$。请画一个这样坐标系的图。从这个图中怎样得到 K_m 和 V_{max}？

9.26　Hanes-Woolf 方程式是米氏方程的另一种变换形式，它能够产生一些适当变化变量的一个线性图。其方程式为：

$$\frac{[S]_0}{v_0} = \frac{[S]_0}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}}$$

推导上述方程式。

9.27 画出一个 Hanes-Woolf 图，怎样从图上得到 K_m 和 V_{max}。

9.28 (a) 以图 9-12 的数据，画出 5% 系数的变量图。(b) 这个图以及分析是否可以客观估计参数?

9.29 (a) 综合米氏方程并 (b) 作一个图解以估算 K_m 和 V_{max}。

9.30 (a) 综合非竞争性抑制的米氏方程（表 9.1）并 (b) 作一个图解以估算 K_I。

9.31 证明如果一个酶被它的产物竞争性抑制，并且 K_I 值与 K_m 值一样，从表 9.1 而来的完整方程式可以写为

$$[S]_t = [S]_0 \exp[-V_{max}t/(K_m + [S]_0)]$$

这是一个单纯的指数衰减方程。

9.32 分离到一个蝙蝠唾液来源的 ATP 酶，当酶浓度为 10^{-8}mmolL^{-1}时，ATP 的水解速率如下：

[ATP] (μmolL^{-1})	5.0	1.7	1.0	0.7	0.56
v_0 (mmmolL^{-1}min^{-1})	2.6	1.95	1.7	1.4	1.24

确定酶的 K_m、V_m 和 k_{cat}。

9.33 Theorell-Chance 酶机制是有关关键复合物的稳态浓度为零的机制中的一种。在 BiBi 反应的情况下，它可表示为：

$$E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1 A}{\rightleftharpoons}} EA \underset{k_{-2}P}{\overset{k_2 B}{\rightleftharpoons}} EQ \underset{k_{-3}Q}{\overset{k_3}{\rightleftharpoons}} E$$

马-肝乙醇脱氢酶与这个基本模型一致。注意重要的 EAB/EPQ 复合物并不存在。(a) 画出应用 Cleland 惯例的反应模式。(b) 证明在变化的底物 A，及 B 为饱和和非饱和水平下 P 和 Q 的抑制模式如下所示：

P 抑制，非饱和 B：	非竞争性抑制
P 抑制，饱和 B：	没有抑制
Q 抑制，非饱和 B：	竞争性抑制
Q 抑制，饱和 B：	竞争性抑制

9.34 与酶浓度相关的底物浓度的变化怎样影响稳态假设的正确性和米氏表达式的适用性?

9.35 在一个米氏酶机制中，对于下列反应速率分别需要怎样的底物浓度（与 K_m 相关）：(a) $0.1V_{max}$；(b) $0.25V_{max}$；(c) $0.5V_{max}$；(d) $0.9V_{max}$?

9.36 对于一个非离子化的底物与一个离子化的酶，证明以 pK_m 对 pH 所作的图在 pH = $-0.5\lg(K_{1e} \cdot K_{2e})$ 时 pK_m 有最大值。

9.37 应用图 9-8，计算下列物质的 Rs。(a) 红细胞中的血红蛋白，(b) 单纯的血红蛋白和 (c) 单纯的肌红蛋白。

9.38 Hill 方程式中的 n 值，当带入实际值之后，将会永远比 1 小吗?

9.39 推导两位点 Adair 方程式。

第10章 代谢：基本原理

10.1 导言

所有的生物体都可将取自周围环境的能量进行转换，以用于维持组织生长及分化需求的大分子的合成。能量转换是通过大量的酶的作用（见第8章）来完成的，这些酶所催化的复杂的似网络的化学反应，总体上被称为代谢。本章只论述这些网络化学反应的基本原理，而详细的代谢过程将在后面的章节中讨论。

10.2 热力学

生物体被看作是一个能与周围环境相互作用的物理化学系统。而热力学则是表达这些系统能量的科学，是与物质的许多性质相关的宏观理论。热力学与分子过程之间的关系可由统计力学的原理来表述。

基本概念：

(a) 系统：是与我们相关的宇宙的任意部分（比如：一个有机体或一个玻璃容器，化学反应可在其中进行）。与系统分割开的宇宙部分即称为系统的环境。

(b) 开放系统：是物质和能量均可与环境进行交换的系统。

(c) 闭合系统：是只能与环境进行能量交换的系统。

(d) 隔离（绝热）系统：是与环境既不进行物质交换也不进行能量交换的系统。

例 10.1

生命有机体是属于开放系统、闭合系统还是隔离系统？

生命有机体属于开放系统，因为它们与周围环境既可以交换热能，也可以进行物质交换（如：营养要素、排泄物）。

(e) 状态函数：指与系统变化相关的一些性质，该变化仅依赖于系统的初始状态和终了状态。下面要讨论的系统的很多重要性质（如内能、焓、熵及 Gibbs 自由能等）都是状态函数。

热力学第一定律

热力学第一定律所表示的内容是如果系统可以与环境进行热交换，或对环境作功，则该系统的内能将发生变化。其数学表达式为：

$$\Delta U = \Delta q - \Delta w \tag{10.1}$$

其中，Δq 表示系统与环境所交换的热能，Δw 表示系统对环境所做的功。

例 10.2

如何决定 Δq 和 Δw 的正负？

若 Δq 为正值，则表示热能被转换入系统，使得系统内能增加；当 Δq 为负值时，表明热能由系统被转换进入环境，使得系统内能减少。Δw 为正值时，系统对环境作功，引起内能下降；相反，Δw 为负值时，环境对系统作功，导致系统内能上升。

问题：如何通过实验测定 ΔU 值？

ΔU 值可以通过在一个绝热的量热器中进行的化学反应而获得。可以测定该化学反应过程中温度的变化，并将其转化成 Δq 值。而化学反应中最常见的功的产生则表现在反应过程中体积的变化方面。功与压力的关系可用下式表示：

$$\Delta w = \int_{v_1}^{v_2} PdV \tag{10.2}$$

v_1 和 v_2 分别表示系统的初始体积及终了体积。因此方程式（10.1）可以表达如下：

$$\Delta U = \Delta q - \int_{v_1}^{v_2} PdV \tag{10.3}$$

对于恒容积的绝热量热器，dV 为零，因而 $\Delta U = \Delta q_v$。对于恒压的绝热量热器，上式的积分式为 $P\Delta V$，因此（10.3）可表示为

$$\Delta U = \Delta q_p - P\Delta V \tag{10.4}$$

问题：量热器是如何工作的？

在恒容积的绝热量热器中（如图 10-1 所示），化学反应是在一恒容积的容器中进行的，其四周为水浴。将量热器与周围环境完好地隔绝，以确保没有任何热量从系统中散出。量热器中所完成的化学反应将引起水浴温度的变化（ΔT），该温度变化又可通过量热器的热容（C）而被换算成 $\Delta q_v = \Delta q_v = C\Delta T$。同理，对于恒压绝热量热器，其反应容器是被设计成恒压状态的，而非恒容积状态。

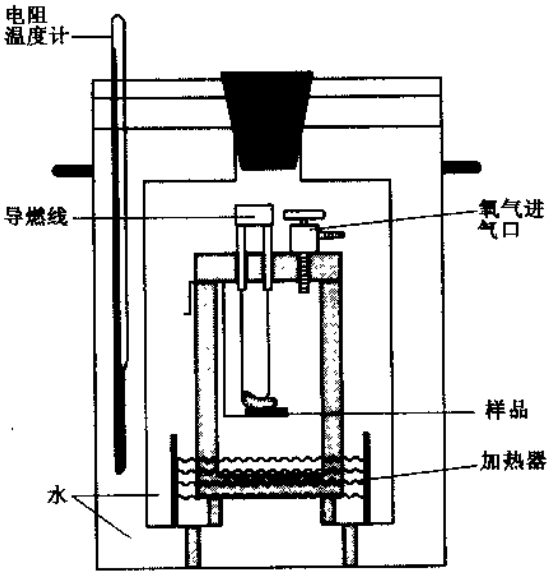


图 10-1　恒体积弹式量热器

焓变

为了方便起见，对众多化学反应的研究都是在恒压，如一个大气压状态下进行的。由方程（10.4）可以看出，恒压反应中热能的变化如下：

$$\Delta q_p = \Delta U + P\Delta V \tag{10.5}$$

此处，热能的变化被称为焓变，用 ΔH 来表示。由于绝大多数生化反应都是在溶液中进行的，体积的变化可以忽略不计，因此 $\Delta H = \Delta U$。

例 10.3

在 310 K 的条件下，葡萄糖和硬脂酸氧化反应的 ΔU 值分别为 -2.9×10^3 kJmol^{-1}和 -11.36×10^3 kJmol^{-1}。(a) 计算这两个反应的 ΔH 值；(b) 这两种物质中哪一个更有利于体内能量的储存？

(a) 葡萄糖的氧化反应式为：

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

反应前后体积没有变化（在 310 K 条件下，O_2 和 CO_2 都是气体）。因此，由方程（10.5）得出 $\Delta U = \Delta H = -2.9\times10^3$ kJmol^{-1}。

硬脂酸的氧化反应式为：

$$C_{18}H_{36}O_2 + 26O_2 \longrightarrow 18CO_2 + 18H_2O$$

可以看出，每氧化 1mol 的硬脂酸将消耗 8mol 的气体（$26O_2 - 18CO_2$）。假设可以运用理想气体定律，即

$$P\Delta V = \Delta nRT \tag{10.6}$$

其中 n 表示气体的摩尔数，R 为气体常数（8.314 $Jmol^{-1}K^{-1}$），T 为绝对温度，则

$$\begin{aligned}\Delta H &= \Delta U + \Delta nRT \\ &= -\ (11.36\times 103 + 8\times 8.31\times 310/1000) \\ &= -11\ 381\ kJmol^{-1}\end{aligned}$$

(b) 很明显，脂肪，如硬脂酸由于其碳原子数目多，因而是远远优于葡萄糖的储能物质。

热力学第二定律

热力学第一定律描述了一个指定反应的能量平衡问题，而热力学第二定律则提出了决定反应能否自发进行的标准。热力学第二定律给出了熵变（ΔS，单位 $J\ K^{-1}$）的概念，恒温条件下，在闭合系统中，熵的变化与单位温度内系统所吸收的热能的变化相关：

$$\Delta S \geqslant \Delta q / T \tag{10.7}$$

等号表示反应可逆，不等号则表示反应不可逆。

Gibbs 自由能

热力学第二定律提出如果 $\Delta q < T\Delta S$ 则反应能自发进行。对于在恒温恒压下进行的反应，$\Delta q = \Delta H$［见方程（10.5）］。因此，对于自发过程：

$$\Delta H - T\Delta S < 0 \tag{10.8}$$

（$\Delta H - T\Delta S$）的量以 ΔG 来表示。即，若反应自发进行，$\Delta G < 0$。符号 G 指 Gibbs 自由能，由下式表述：

$$G = H - TS \tag{10.9}$$

对于恒温恒压反应，

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \tag{10.10}$$

在忽略与压力或体积相关的功的前提下，ΔG 值给出了反应过程中最大的功。ΔG 可以每摩尔物质的焦耳数或卡数表示（4.186J = 1cal）。

例 10.4

高等动物所转化的绝大部分能量都可以从葡萄糖的氧化方面获得：

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

已知反应的 $\Delta H = -2\ 808\ kJmol^{-1}$，$\Delta S = 182.4\ kJmol^{-1}$，那么在 310 K 条件下，氧化 1mol 葡萄糖可以获得多少能量？

我们利用：

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -(2\ 808\times 10^3 + 310\times 182.4) = -2\ 865\ kJmol^{-1}$$

因此，在 310 K 条件下每消化 1mol 的葡萄糖，即可给动物提供 2 865 kJ 的非 PV 功。

标准状态

某一纯物质，在指定温度及 1 个大气压（101.325kPa）下能稳定存在的状态称为该纯物质的标准状态。对于溶质，其标准状态更适合于以 $1molL^{-1}$ 表示。在溶液中进行的化学反应，其标准自由能变化是将 $1molL^{-1}$ 反应物转化为 $1molL^{-1}$ 产物的能量变化。

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \tag{10.11}$$

生化标准状态

很多的生物学过程都包含有氢离子；（根据定义）氢离子溶液的标准状态是 1molL ^{1}，而溶液 pH 值接近零，这与大部分生物体形态不相吻合。因此，以 1molL^{-1}定义溶质的生物化学标准状态适用于除氢离子以外的所有组分，而氢离子则以 10^{-7}molL^{-1}（pH 7）表示。生化标准状态自由能变化以 $\Delta G^{0\prime}$表示，其他的热力学参数的表示与此类似（$\Delta H^{0\prime}$、$\Delta S^{0\prime}$等等）。

反应平衡与自由能

对于化学反应

$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$$

其自由能变化

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln\left(\frac{([C]/[C]^0)^c([D]/[D]^0)^d}{([A]/[A]^0)^a([B]/[B]^0)^b}\right) \tag{10.12}$$

$[A]^0$、$[B]^0$、$[C]^0$ 和 $[D]^0$ 为标准状态下反应物的浓度，对于在溶液中进行的反应来说，这些浓度均为 1mol L^{-1}，因此，方程（10.12）可简化为

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln\left(\frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}\right) \tag{10.13}$$

若该化学反应是平衡的（即，可逆过程），则 $\Delta G = 0$。所以，由方程（10.13）可以得出

$$\Delta G^0 = -RT \ln\left(\frac{[C]_e^c[D]_e^d}{[A]_e^a[B]_e^b}\right) \tag{10.14}$$

其中，下标的 e 表示反应物的平衡浓度。可以看出，圆括号内的表达式为该反应的平衡常数（K_e）。所以，

$$\Delta G^0 = -RT\ln K_e \tag{10.15}$$

例 10.5

葡糖磷酸变位酶催化下列反应

$$1\text{-磷酸葡萄糖} \rightleftharpoons 6\text{-磷酸葡萄糖}$$

ΔG^0 为 -7.3 kJmol^{-1}。若在 310K 条件下，在浓度为 2×10^{-4} molL^{-1}的 1-磷酸葡萄糖溶液中加入葡糖磷酸变位酶，各组分的平衡浓度为多少？

由方程（10.15）得出：

$$K_e = \exp(-\Delta G^0/RT) = \exp(7.3\times10^3/(8.31\times310)) = 17.00 \tag{10.16}$$

因此

$$\frac{[6\text{-磷酸葡萄糖}]_e}{[1\text{-磷酸葡萄糖}]_e} = 17.00$$

并且

$$[1\text{-磷酸葡萄糖}] + [6\text{-磷酸葡萄糖}] = 2\times10^{-4}\ \text{molL}^{-1}$$

所以，

$$[6\text{-磷酸葡萄糖}]_e = 1.89\times10^{-4}\ \text{molL}^{-1}$$

$$[1\text{-磷酸葡萄糖}]_e = 1.11\times10^{-5}\ \text{molL}^{-1}$$

平衡常数随温度的变化

由方程（10.15）得出：

$$\ln K_e = -\Delta G^0/RT \tag{10.17}$$

变换成：

$$\frac{d\ln K_e}{dT} = -\frac{1}{R}\frac{d\left(\frac{\Delta G^0}{T}\right)}{dT} \tag{10.18}$$

利用方程（10.11）　　$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$

得出

$$\frac{\Delta G^0}{T} = \frac{\Delta H^0}{T} - \Delta S^0 \tag{10.19}$$

假设 ΔH^0 和 ΔS^0 不随温度变化，则

$$\frac{d\left(\frac{\Delta G^0}{T}\right)}{dT} = -\frac{\Delta H^0}{T^2} \tag{10.20}$$

因此，由（10.18）和（10.20）得出

$$\frac{d\ln K_e}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \tag{10.21}$$

该方程式称为 van't Hoff 等容线，其积分式更有用处：

$$\int_{K_1}^{K_2} d\ln K_e = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\Delta H^0}{RT^2} dT \tag{10.22}$$

例 10.6

磷酸化酶 b 可与 AMP 相结合：

$$\text{磷酸化酶 b·AMP} \rightleftharpoons \text{磷酸化酶 b} + \text{AMP}$$

该反应平衡常数在 286 K 时为 2.75×10^{-5} mol L^{-1}，在 313 K 时为 5.9×10^{-5}molL^{-1}。那么在 303 K 时，该反应的 ΔH^0、ΔS^0 和 ΔG^0 各为多少？

设 ΔH^0 不随温度变化，将数据带入方程（10.22），

$$\ln\left(\frac{5.9 \times 10^{-5}}{2.75 \times 10^{-5}}\right) = -\frac{\Delta H^0}{8.31}\left(\frac{1}{313} - \frac{1}{286}\right)$$

得出　　$\Delta H^0 = 21.03$ kJmol^{-1}

利用此值，我们可以算出在 303 K 时的平衡常数

$$\ln\left(\frac{K_{303}}{5.9 \times 10^{-5}}\right) = \frac{-21.03 \times 10^3}{8.31}\left(\frac{1}{303} - \frac{1}{313}\right) = -2.2668$$

得出　　$K_{303} = 4.5 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}

将此值带入方程式　　$\Delta G^0 = -RT \ln K_e$

得出　　$\Delta G^0_{303\,K} = 25.2$ kJmol^{-1}

再利用　　$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$

计算出 ΔS^0 为 -13.8 JK^{-1} mol^{-1}。

10.3　氧化还原反应

包含有氧化过程与还原过程（氧化还原反应）的化学反应是代谢的中心问题。由碳水化合物氧化得到的能量是与 ATP 的合成相偶联的，此偶联作用通过一系列的氧化还原反应，线粒体的电子传递连（见第 14 章）来完成的。另外，地球上的大部分生命都依赖于一系列的氧化还原反应来进行光合作用。光合作用可利用太阳能产生 ATP 和 O_2，并用 CO_2 合成碳水化合物。

基本概念

（a）氧化反应：是物质丢失电子的反应。

（b）还原反应：是物质获得电子的反应。

（c）半电池反应：指氧化还原反应中的氧化过程或还原过程。

例 10.7

下列氧化还原反应中的半电池反应是什么？

$$Zn + Cu^{2+} \rightleftharpoons Zn^{2+} + Cu$$

氧化半电池反应是

$$Zn \longrightarrow Zn^{2+} + 2e^-$$

还原半电池反应是

$$Cu^{2+} + 2e^- \longrightarrow Cu$$

氧化还原反应中的自由能变化：

下面的方程式表示了氧化还原反应中自由能的变化

$$\Delta G = -nFE \tag{10.23}$$

其中 n 是指从被氧化物质分子转移到被还原物质分子上的电子数，E 是指阻碍电子转移的电动势（以伏特为单位），F 是法拉第常数，是转换因子，数值为 96.5 kJV^{-1}。若氧化还原反应的各组分均处于标准状态，则方程式（10.23）可写成：

$$\Delta G^0 = -nFE_0 \tag{10.24}$$

例 10.8

下列反应的 ΔG^0 为 $-213\ kJmol^{-1}$，

$$Zn + Cu^{2+} \rightleftharpoons Zn^{2+} + Cu$$

该反应的 E_0 为多少？

由方程式（10.24）得出

$$E_0 = -\frac{\Delta G^0}{nF} = \frac{213}{2 \times 96.5} = 1.1\ V \tag{10.25}$$

（该反应中有两个电子被转移）。

电化学电池

可以利用电化学电池来研究氧化还原反应。例 10.8 中化学反应的电化学电池如图 10-2 所示。Cu 和 Zn 电极被分别插入含相应离子的溶液中，而盐桥（含饱和 KCl 溶液）使得两份溶液之间保持有电子联系。若 Zn 被氧化成 Zn^{2+}，同时在 Cu 的半电池 Cu^{2+} 被还原成 Cu，则电子由 Zn 的半电池流向 Cu 的半电池。该反应的 E 值可以通过测量电位差（以伏特为单位）而得到。此电位差可阻止电子流的产生。

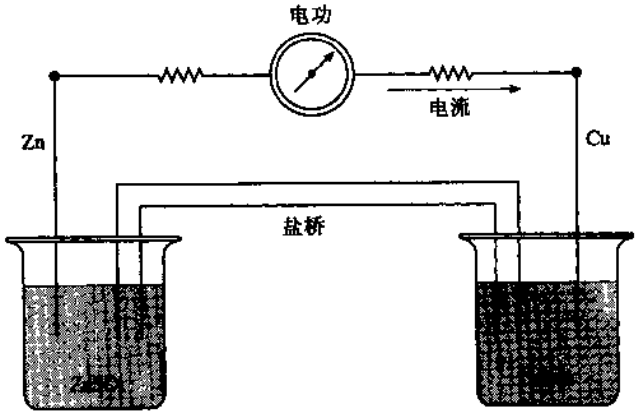


图 10-2　电化学电池

半电池电极电势

半电极反应是无法被孤立开进行研究的。当两个半电池被联接在一起形成电化学电池时，所能测定的是电位差（ΔE）。半电池的相对电极电位是参比于标准氢电极的而得到的，

标准氢电极的 E_0 被设定为零。氢的半电极反应为：

$$H^+ + e^- \rightleftharpoons \frac{1}{2}H_2\ (Pt)$$

1 个大气压下，1mol L^{-1}的 H^+溶液中，氢气可自 Pt 电极处溢出。其它半电池反应（反应组分在标准状态下）的 E_0 值可通过将该电极与氢电极相连接形成的电化学电池而测得。

通常，半电池的标准电势可以还原电势来表示（对于还原反应），数值越负则失电子倾向越大。

E_0 与 E 的关系

在溶液中进行的氧化还原反应

$$A_{氧化} + B_{还原} \longrightarrow A_{还原} + B_{氧化}$$

其自由能变化

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT\ \ln\left(\frac{[A_{还原}][B_{氧化}]}{[A_{还原}]^0[B_{氧化}]^0} \Big/ \frac{[A_{氧化}][B_{还原}]}{[A_{氧化}]^0[B_{还原}]^0}\right) \tag{10.26}$$

运用方程式（10.23）

$$\Delta G = -nFE$$

对于溶质，再利用 $[A_{还原}]^0 = [B_{氧化}]^0 = 1mol\ L^{-1}$等因素［方程式（10.13）］，得出

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{[A_{还原}][B_{氧化}]}{[B_{还原}][A_{氧化}]}\right) \tag{10.27}$$

该方程式为能斯特氧化还原方程式，给出了任意氧化还原反应或半电池反应的 E 与 E_0 的关系。

例 10.9

对于半电池反应

$$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH$$

1mol L^{-1}的 NAD^+和 NADH 溶液在 pH 7，298 K 时，已知 E_0 值为 −0.11V，其 E 值为多少？

根据该反应，能斯特氧化还原方程式可写成

$$E = E_0 - \frac{RT}{2F}\ln\left(\frac{[NADH]}{[NAD^+][H^+]}\right)$$

将 E_0 值、[NADH]、[NAD^+] 带入上式，得到

$$E_0 = -0.11 - \frac{8.31 \times 398}{2 \times 9.65 \times 10^4}\ln(10^{+7}) = -0.32\ V$$

由于上述反应的各组分均处于生化标准状态（见 10.2），其 E 值实际上被定义为该半电池反应的 E_0'（注意符号′）。

10.4　ATP 及其在生物能学方面的作用

ATP 的特性

ATP 以 $10^{-3} \sim 10^{-2}$ molL^{-1}的浓度存在于所有的活细胞中。ATP 分子由三部分组成：腺嘌呤，D-核糖，及以酯键相连的三个磷酸基团（见第 7 章）。与 ATP 相似的另外两个化合物是 AMP 和 ADP，分别含有一个与两个磷酸基团。

热力学参数提示，ATP 非常倾向于水解成 ADP 和磷酸：

$$ATP^{4-} + H_2O \longrightarrow ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+$$

在生化标准状态下（ $[ATP^{4-}] = [ADP^{3-}] = [HPO_4^{2-}] = 1mol\ L^{-1}$，$[H^+] = 10^{-7}$ mol L^{-1}，$T = 310$ K），该反应的热力学参数 $\Delta G^{0'} = -30.5$ kJ mol^{-1}，$\Delta H^{0'} = -20$ kJ mol^{-1}，

$\Delta S^{0\prime} = 34\ \mathrm{J\ K^{-1}\ mol^{-1}}$。

问题：从热力学方面看，为什么 ATP 易于水解？

ATP 水解反应易产生焓变，其原因有①ATP 分子间负电荷的静电排斥大于反应产物的，②反应产物是共振稳定的，③反应产物溶剂化产生的焓远大于 ATP。ATP 水解反应又由于释放出了一个磷酸基团而产生熵变。这些都提示 ATP 水解反应有很强的温度依赖性［见方程（10.7）］。

通常 ATP 被认为富含能量或含高能磷酸酯键。这样的称谓暗示 ATP 水解的整体过程有较大的 $\Delta G^{0\prime}$ 和 $\Delta H^{0\prime}$ 的负值。

ATP 在生物能学方面的作用：

与很多其他的生物化合物相比，ATP 并非高能化合物。ATP 的功能与其水解过程的 ΔG 值极为相关，该值介于其他磷酸酯水解反应的 ΔG 值之间。因此，ATP 与 ADP 可作为磷酸集团转移的供体-受体对。很多情况下，ATP 水解自由能被用于支持另一些在热力学上不易发生的反应，通常是将这些反应中某一反应物磷酸化而起到支持作用的。

例 10.10

在热力学上，由谷氨酸和 NH_4^+ 来合成谷氨酰胺是不可能的：

$$\text{谷氨酸}^- + NH_4^+ \longrightarrow \text{谷氨酰胺} \qquad (\Delta G^{0\prime} = 14.2\ \mathrm{kJmol^{-1}})$$

那么，ATP 的水解是如何为上述反应合成谷氨酰胺提供可能性的呢？

上述反应由于利用 ATP 而发生改变。新的反应在热力学上是可能的，由两个分步反应组成，这两个分步反应通过 ATP 水解形成的共同中间体而连接：

$$\text{谷氨酸}^- + ATP^{4-} \longrightarrow \text{5-磷酸谷氨酸}^{2-} + ADP^{3-}$$

$$\text{5-磷酸谷氨酸}^{2-} + NH_4^+ \longrightarrow \text{谷氨酰胺} + \text{磷酸}^-$$

这两步反应综合为

$$\text{谷氨酸}^- + ATP^{4} + NH_4^+ \longrightarrow \text{谷氨酰胺} + ADP^{3-} + \text{磷酸}^-$$

该反应的 $\Delta G^{0\prime}$ 为 $-16.3\ \mathrm{kJmol^{-1}}$，因此变成热力学可能。动物细胞内的谷氨酰胺合成酶催化此反应（见第 15 章）。

10.5　代谢途径的控制步骤

一般来说，起调控作用的酶要符合两个准则：以低酶活形式存在，并能催化那些在细胞内未达到平衡的反应。由于关键酶催化代谢途径中最慢的步骤（限速步骤），因而这两个准则都起作用。酶是可能以低活力形式存在的。如果是这样，那么酶催化的反应在活体内是不可能处于平衡位点的，因为在底物与其它化合物反应之前没有足够的酶能使其平衡。

代谢途径中限速步骤的确定

通过体外测定某一代谢途径中酶的活力可确定限速步骤，如利用所取组织的匀浆液及与细胞内环境相似的分析条件（pH、温度、离子强度（见习题 10.3）和底物浓度等）来测定酶活力。在某些条件下，已能够使用核磁共振（NMR）光谱测定活体内酶的活力。

非平衡反应的检测

非平衡反应可以通过测定组织中代谢物的浓度来确定。习惯上，将采得的组织样品迅速地置两片于液氮中预冷至 77 K 的金属片（冷冻夹）中压紧冷冻。此冷冻过程可快速阻止任何能引起代谢物浓度改变的酶解反应；随后，利用化学分析手段或酶分析法测出代谢物浓

度。近年来，^{31}P-NMR 光谱已能够较准确地测定出活细胞或活组织中 ATP、AΔP、AMP、磷酸、磷酸肌酸等代谢物的浓度。

一旦已知代谢物浓度，就可计算出质量作用率（Γ）。对于下列反应：

$$A+B+C+\cdots\cdots \rightleftharpoons P+Q+R\cdots\cdots$$

$$\Gamma=\frac{[P][Q][R]\cdots}{[A][B][C]\cdots} \tag{10.28}$$

Γ值与反应平衡常数的比较可以确定活体内该反应是否已接近平衡状态。

例 10.11

下表所列的是用葡萄糖灌流后大鼠心脏代谢物浓度的数据数据：

代谢物	胞内浓度/（mmol L^{-1}）
ATP	11.5
ADP	1.3
AMP	0.17
6-磷酸果糖	0.09
1，6-二磷酸果糖	0.02

（a）磷酸果糖激酶和（b）腺苷酸激酶是心脏代谢的关键酶吗？

（a）对于磷酸果糖激酶反应

$$6\text{-磷酸果糖}+ATP \xrightarrow{Mg^{2+}} 1,6\text{-二磷酸果糖}+ADP$$

$$\Gamma=\frac{[1,6\text{-二磷酸果糖}][ADP]}{[6\text{-磷酸果糖}][ATP]}$$

$$=(0.02\times1.3)/(0.09\times11.5)=0.025$$

此Γ值远远小于反应平衡常数（~1 200）；可见，大鼠心脏内该反应远未达到平衡，所以，磷酸果糖激酶可能是关键酶。

（b）对于腺苷酸激酶反应

$$ATP+AMP \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} 2ADP$$

$$\Gamma=\frac{[ADP]^2}{[ATP][AMP]}=(1.3)^2/(11.5\times0.17)=0.86$$

此Γ值与反应平衡常数（~0.4）相近；因此，该反应不可能是代谢途径中的关键反应。

请留意我们假设了细胞内的代谢物都可被酶所利用，而没有考虑代谢分区化可能产生的效应（见 10.7）。因此，基于质量作用率来判断是否为关键酶时应加以慎重。

交换原则

本原理与一些扰乱代谢途径的实验相关，如，在代谢过程中加入酶的抑制剂或激活剂。若某一反应受到干扰，则其代谢通路中关键酶反应前后的代谢物浓度将向反方向变化，因为关键酶所催化的是代谢途径中反应速度慢的限速步骤。例如，若某一干扰反应引起酶活力的降低，那么该酶的底物浓度将增加，而反应产物的浓度将减少。此原则仅对无旁路的线性代谢通路有效。

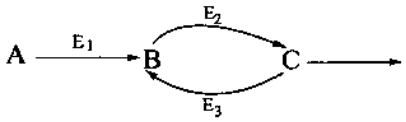
10.6　调控信号的放大

对于某一调控信号，其代谢途径的通量响应，非单一的酶催化反应的通量响应（单位时间内的质量流量），取决于信号放大机制。调控信号通常受底物浓度或其他效应因子的影响

而变化。这些化学信号由底物循环或互变酶循环放大。

底物循环

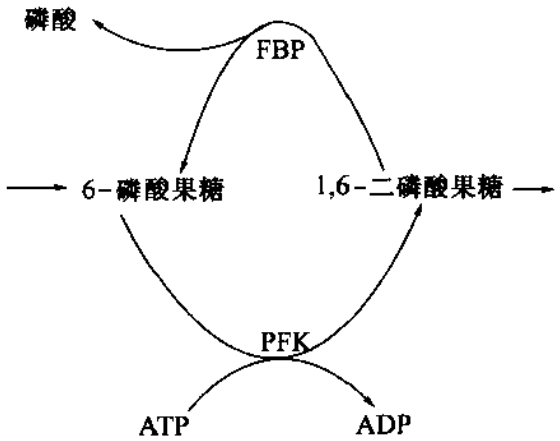
下面一段代谢通路中



底物循环发生在B与C之间：不同的酶催化这两个代谢物的互变反应。E_2的速率减去E_3的速率为此步反应的净通量。如果这两个酶促反应的速率是分别调控的，那么，流经代谢途径通量将随调节剂浓度的改变而变化，且变化较单一酶调控的反应要敏感得多。

例 10.12

糖酵解中，磷酸果糖激酶（PFK）和果糖1,6-二磷酸酶（FBP）形成底物循环：



通过提高AMP的浓度，PFK酶活性将增高，而FBP酶活性降低。下表所列的数据是这两种酶随AMP浓度变化的饱和分数（见第9章）。

AMP浓度/（任意浓度单位）	饱和分数
0	0
2.5	0
12.5	0.89

当AMP浓度单位由2.5上升至12.5时，计算流经代谢途径的通量，假设PFK与FBP的最大酶活力分别为100和10 mmol $L^{-1}min^{-1}$，那么，缺乏AMP时PFK无活性，有AMP存在时FBP无活性。

PFK活力由下式计算

$$\text{PFK 活力} = \text{最大酶活力} \times \text{与 AMP 结合的酶的百分数}$$

同样，FBP活力由下式计算

$$\text{FBP 活力} = \text{最大酶活力} \times \text{未与 AMP 结合的酶的百分数}$$

当AMP浓度为2.5时，

$$\text{PFK 活力} = 100 \times 0.093 = 9.3 \text{ mmol } L^{-1}min^{-1}$$

$$\text{FBP 活力} = 10 \times (1.0 - 0.093) = 9.1 \text{ mmol } L^{-1}min^{-1}$$

因此，流经此步糖酵解的相对通量为

$$\text{通量} = \text{PFK 活力} - \text{FBP 活力}$$

$$= 9.3 - 9.1 = 0.2 \text{ mmol } L^{-1}min^{-1}$$

当 AMP 浓度为 12.5 时，同理可以得出

$$\text{PFK 活力} = 100 \times 0.89 = 89 \text{ mmol L}^{-1}\text{min}^{-1}$$

$$\text{FBP 活力} = 10 \times (1.0 - 0.89) = 1.1 \text{ mmol L}^{-1}\text{min}^{-1}$$

$$\text{通量} = 87.9 \text{ mmol L}^{-1}\text{min}^{-1}$$

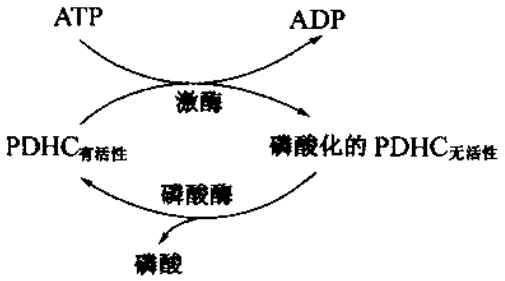
在 AMP 浓度仅增大 5 倍（12.5/2.5）的情况下，底物循环却引起了代谢途径通量的近 440 倍（87.9/0.2）的增加。

互变酶循环

有些调节酶可以不同的形式存在，这些形式之间的相互转化是由酶催化的。若催化转化的酶的活性是受控于效应剂浓度的变化的，那么化学信号就会被放大。

例 10.13

哺乳动物体内丙酮酸脱氢酶复合体（PDHC）的活性是随复合体的酶催化磷酸化作用（见第 12 章）而变化的。



那么，为了控制丙酮酸进入三羧酸循环，激酶和磷酸化酶的活性是如何被调节的？

当丙酮酸经 PDHC 复合体的作用被转化成乙酰-CoA 后即可进入三羧酸循环。三羧酸循环将 NAD^+ 还原成 NADH，NADH 再进入线粒体电子传递链。

因此，无论是乙酰-CoA/CoA 的比率增大，还是 NADH/NAD^+ 的比率增大，都将使得 PDHC 失活。有三条途径可导致 PDHC 失活：①NADH/NAD^+ 的比率增大时激酶被激活，②乙酰-CoA/CoA 的比率增大时激酶也被激活，③NADH/NAD^+ 的比率增大时磷酸酶活性被抑制。所以，有活性的 PDHC 在总 PDHC 中所占的百分比对细胞的代谢需求是极其敏感的。

10.7　细胞内的区室与代谢

原核细胞通常没有亚细胞结构，体积约为 0.03～500 μm^3，而真核细胞则包含很多独立的亚细胞器（见第 1 章），细胞体积也较大，约为 50～15 000 μm^3。破碎了细胞或组织后，可以通过差速离心分离亚细胞器；不同大小及不同密度的细胞器会在不同的离心速率下沉淀，从而分离开。

代谢途径的区室化作用

主要的代谢途径之间有很多互连作用。很多底物，调节剂分子及一些酶是多条代谢途径共同的。在掌握了以下三方面的知识后，才能对互连作用有较好的理解，①亚细胞的定位及其所包含的酶的浓度，②不同亚细胞器中代谢物的浓度，③亚细胞器之间代谢物的透性障本质；透性障将细胞分隔成多个区室。

酶的定位

利用差速离心可分离得到各个不同的亚细胞器，测定其中酶的活性便可确知酶在不同亚细胞器内的分布。例如，糖酵解的酶在细胞质内，而与其相反的过程，糖异生作用（见第

11 章）的酶的分布则复杂得多。糖异生途径中，果糖二磷酸酶，与糖酵解的酶一样在细胞质中，丙酮酸羧化酶则在线粒体基质中，另外，同样是磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶，大鼠的在细胞质内，鸽子的却在线粒体中。

代谢物的定位

确定不同亚细胞器或区室中代谢物的浓度是相当复杂的任务，因为，在分离亚细胞器期间，代谢物的浓度可能发生改变，而且在分离亚细胞器的过程中低分子质量的代谢物也有可能透过亚细胞器的膜。对于细胞质中腺嘌呤、烟酰胺核苷酸浓度的研究，以及线粒体中三羧酸循环中间物浓度的研究都很受瞩目，很多情况下，可通过测定酶催化的已达到平衡状态的反应来估算它们的浓度。

例 10.14

乳酸脱氢酶是细胞质酶，在很多细胞中，当反应达到平衡时，它以相当高的浓度存在。

$$\text{乳酸} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{丙酮酸} + NADH + H^+$$

该反应的平衡常数已由体外研究得知。那么，如何将此平衡常数应用于计算细胞质内 NADH /NAD^+ 的比例呢？

细胞质内丙酮酸和乳酸的浓度可由冷冻夹实验的结果得出。因此，根据已知的细胞质 [H^+] 及反应平衡常数（K_e）

$$K_e = \frac{[\text{丙酮酸}][NADH][H^+]}{[\text{乳酸}][NAD^+]}$$

估计 NADH/NAD^+ 的比率约为 1:1 000。

问题解答

热力学

10.1　在一恒体积的绝热量热器中，在 298 K 的条件下，乙酸样品（1 mol）被完全氧化成 CO_2 和 H_2O，释放出的热量为 847 kJ。计算乙酸氧化反应的 ΔH 值。

答：

在恒体积条件下，被系统吸收的热量相当于 ΔU。由于热量被释出（由系统转入环境），因此

$$\Delta U = -\Delta q_v = -874\ \text{kJmol}^{-1}$$

根据下列方程，ΔU 与 ΔH 相关

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V$$

已知乙酸的氧化反应式如下：

$$CH_3COOH + 2O_2 \longrightarrow 2CO_2 + 2H_2O$$

可以看出，反应前后没有体积的变化（298 K 时 O_2 和 CO_2 都是气体），所以氧化反应 ΔH 值为 $-874\ \text{kJmol}^{-1}$。

10.2　延胡索酸（HOOC—CH═CH—COOH）完全氧化的 ΔH^0 值是 $-1\ 336\ \text{kJmol}^{-1}$，已知下列数据：

$$C + O_2 \longrightarrow CO_2 \quad \Delta H^0 = -393\ \text{kJmol}^{-1}$$

$$H_2 + O_2 \longrightarrow H_2O \quad \Delta H^0 = -285.5\ \text{kJmol}^{-1}$$

根据延胡索酸的组成元素计算它的生成焓（ΔH^0）。

答：

由于焓是状态函数，因此，可以通过将下列反应的焓值加和而计算出延胡索酸的生成焓 ΔH^0：

$$\begin{array}{rr} & \Delta H^0 \\ 4C + 4O_2 \longrightarrow 4CO_2 & -1\ 572\ kJ \\ 2H_2 + O_2 \longrightarrow 2H_2O & -571\ kJ \\ 4CO_2 + 2H_2O \longrightarrow C_4H_4O_4 + 3O_2 & +1\ 336\ kJ \end{array}$$

总反应式：

$$4C + 2H_2 + 2O_2 \longrightarrow C_4H_4O_4 \qquad \Delta H^0 = -807\ kJmol^{-1}$$

这一过程是表示连续反应热量总和的 Hess 定律的一个实例，其理论依据是任何反应的 ΔH 仅与其起始状态和终了状态相关，该过程还说明了很难由实验测定的 ΔH 值的简便的计算方法。

10.3　组织中，细胞内 Na^+ 和 K^+ 的浓度分别为 10 mmol L^{-1} 和 90 mmol L^{-1}，而胞外浓度分别为 140 mmol L^{-1} 和 4 mmol L^{-1}。计算维持该离子梯度所需的自由能。

答：

我们可以用下面的平衡式来表示离子梯度：

$$Na^+_{内} \quad Na^+_{外}$$

$$K^+_{内} \quad K^+_{外}$$

以上两种情况的 ΔG 值均可由下面的表达式给出：

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln\left(\frac{[离子]_{外}}{[离子]_{内}}\right)$$

$$\Delta G^0 = -RT \ln\left(\frac{[离子]_{外}}{[离子]_{内}}\right)_e$$

式中下标 e 是指离子的平衡浓度。平衡时，细胞内外的离子浓度应该相等。因而，$\Delta G^0 = 0$，故维持离子梯度所需的自由能为：

$$\Delta G = RT \ln\left(\frac{[离子]_{外}}{[离子]_{内}}\right)$$

将 Na^+ 和 K^+ 浓度分别带入方程式中，得到

$$\Delta G_{Na^+} = 6.8\ kJmol^{-1}$$

$$\Delta G_{K^+} = 8.0\ kJmol^{-1}$$

计算中我们做了一些假设，最明显的是设溶液为理想溶液，溶质分子间没有任何相互影响（吸引或排斥）。而实际上，这种情况是不可能存在的，特别是在中等浓度的离子溶液中。那么，对于非理想状态（溶质分子间有相互作用）的溶液，就需要在热力学计算中作修正，以溶质的活度代替浓度来计算。溶质的活度（α）通过活度系数（γ）而与其浓度（C）相关联。

$$\alpha = \gamma C \tag{10.29}$$

对于电解质溶液，γ 值可利用 Debye-Hückel 原理计算出。25℃ 时，溶液中正负离子的平均活度系数（$\gamma_\pm$）为：

$$\lg\gamma_\pm = -0.5 z_+ z_- I^{1/2} \tag{10.30}$$

z_+ 和 z_- 分别是指正负离子所带的电荷数，I 为溶液的离子强度：

$$I = \frac{1}{2}\sum C_i z_i^2 \tag{10.31}$$

表示了溶液中所有离子类型的加和。

10.4　计算 0.25 molL^{-1} Na_3PO_4 溶液的平均活度系数。

答：

Na_3PO_4 在水溶液中完全解离，所以，首先根据方程式（10.31）来计算溶液的离子强度：

$$I=\frac{1}{2}\left(C_{Na^+}z_{Na^+}^2+C_{PO_4^{3-}}z_{PO_4^{3-}}^2\right)=\frac{1}{2}\left(0.75\times1^2+0.25\times3^2\right)=1.5\ \text{mol L}^{-1}$$

由于 $z_+=1$，$z_-=3$，故根据方程（10.30）：

$$\lg\gamma_\pm=-1.837$$

$$\gamma_\pm=0.0146$$

严格地说，计算得到的此 $\gamma_\pm$ 值只在298K条件下有效，因为方程式（10.30）中的常数（0.5）在其他温度时会略有变化。

10.5 酸HA的解离式为：

$$HA\rightleftharpoons H^+ + A^-$$

推导出溶液pH值与已解离的酸的浓度和未解离的酸的浓度（$[A^-]$ 和 $[HA]$）之间关系的表达式。

答：

解离平衡常数为

$$K_a=\frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

即

$$\lg K_a=\lg[H^+]+\lg\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

由于 $pH=-\lg[H^+]$

$$\therefore\quad -\lg K_a=pH-\lg\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

以 pK_a 取代 $-\lg K_a$

则

$$pK_a=pH-\lg\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

这便是Henderson-Hasselbalch方程式（见第3章）。

氧化还原反应

10.6 计算下列反应的 $\Delta G^{0'}$ 值：

$$\text{丙酮酸}+NADH+H^+\longrightarrow\text{乳酸}+NAD^+$$

半电池反应是：

$$\text{丙酮酸}+2H^++2e^-\longrightarrow\text{酸}\qquad E_0'=-0.19\ V$$

$$NAD^++H^++2e^-\longrightarrow NADH\qquad E_0'=-0.32\ V$$

答：

由半电池反应可以算出整个反应的 E_0' 为 $-0.19-(-0.32)=0.13V$。根据方程式

$$\Delta G^{0'}=-nFE_0'$$

该反应中 $n=2$，

$$\Delta G^{0'}=-2\times9.65\times10^4\times0.13\ \text{Jmol}^{-1}=-25.1\ \text{kJmol}^{-1}$$

请注意，对于一个氧化还原反应，正的 E_0' 值预示着该反应在热力学上是可能进行的，$\Delta G^{0'}$ 值为负。

10.7 在静电场 ψ 中（假设为标准状态），一个带电荷 z 的离子的电化学电位 μ 由下列方程式给出：

$$\mu=zF\psi+\mu^0+RT\ln X\qquad(10.32)$$

其中 μ^0 是离子在标准状态下的化学势（单位摩尔的自由能），X 为离子的摩尔分数，即

$$X=\frac{(\text{离子摩尔数})}{(\text{离子摩尔数})+(\text{溶剂摩尔数})}\qquad(10.33)$$

对于稀溶液，(溶剂摩尔数) ≫ (离子摩尔数)，则

$$X=\frac{(\text{离子摩尔数})}{(\text{溶剂摩尔数})} \tag{10.34}$$

根据化学渗透说，对于氧化磷酸化作用（见第 14 章），电子传递链中电子流是与质子在跨越线粒体内膜时所产生的质子浓度梯度相偶联的。推导出质子在作跨膜运动时的电化学电位差。

答：

质子作跨膜运动时的电位差为

$$\Delta\mu=\mu_{内}-\mu_{外}$$

再由方程（10.32）得出

$$\Delta\mu = zF(\psi_{内}-\psi_{外})+RT\ \ln\left(\frac{[H^+]_{内}}{[H^+]_{外}}\right)$$

即

$$\Delta\mu=zF\Delta\psi-2.3RT\Delta pH \tag{10.35}$$

$\Delta\psi$ 是跨膜时产生的电位差，ΔpH 则是跨膜时产生的 pH 差值。

这就是能斯特电位方程。

ATP 及其在生物能学中的作用

10.8　ATP 的带负电荷的磷酸基团可有效地与二价阳离子如 Mg^{2+} 螯合。已知下列反应的络合平衡常数为 $10^4\ L mol^{-1}$，

$$Mg^{2+}+ATP^{4-} \rightleftharpoons MgATP^{2-}$$

若游离 Mg^{2+} 的浓度是 $2\times10^{-2}\ mol\ L^{-1}$，计算细胞内与 Mg^{2+} 络合的 ATP 占 ATP 总量的百分数。

答：

$$\frac{[MgATP^{2-}]}{[Mg^{2+}][ATP^{4-}]}=10^4 L\ mol^{-1}$$

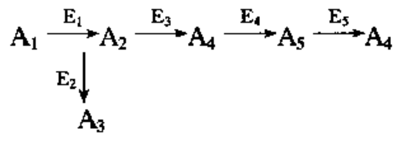
即

$$\frac{[MgATP^{2-}]}{[ATP^{4-}]}=2\times10^2$$

可见，细胞内百分之九十九以上的 ATP 都是以 Mg^{2+} 络合物的形式存在的。那么，无怪乎大多数利用 ATP 的酶均以 $MgATP^{2-}$ 为底物，而非 ATP^{4-}。

代谢途径中的关键步骤

10.9　下图是代谢物 $A_1 \sim A_6$ 的酶促互转作用的假设图



在调节代谢物 A_6 浓度方面，图中哪个酶是最适的调控酶？

答：

如果酶 E_1 受高浓度 A_6 的反馈抑制，则导致 A_2 生成量的减少。并同时产生 A_3 减少的负面效应，A_3 的生成是由酶 E_2 催化的。如若 E_3 是代谢调控酶，则不会出现上述的情况，因为 E_3 才是催化 A_6 生成的第一个关键步骤的酶。

调控信号的放大

10.10　磷酸果糖激酶-果糖-1,6-二磷酸酶底物循环是否有能量损失？

答：

事实上，作为 ATP 酶，底物循环是有作用缺陷的。ATP 虽被转化成 ADP 和磷酸，

却并无1,6-二磷酸果糖的净生成。但这一损失又不足以与其优越性相比，其优越性是以低物循环形式赋予动物有效的调控机制。

细胞内的区室化作用与代谢

10.11 琥珀酸脱氢酶（见第12章和第14章）催化下列反应：

$$\text{琥珀酸} + \text{FAD} \longrightarrow \text{延胡索酸} + \text{FADH}_2$$

将大鼠的肝脏匀浆，再经差速离心分离各细胞器，最后测定各细胞器制备液中琥珀酸脱氢酶的活力，结果如下表：

细胞器制备液	琥珀酸脱氢酶活力（占总活力的百分数）/%
核	11
线粒体	75
溶酶体	6
质膜	5
细胞质	3

如何利用这些数据来研究细胞内的区室化作用？

答：

上表的数据显示，琥珀酸脱氢酶主要在线粒体中，可作为线粒体的标志酶。标志酶可以用来判断某一亚细胞组分被其他细胞器污染的程度，例如，上述情况中，很明显地看出核的制备液受到线粒体的污染。

补充问题

10.12 溶液的渗透压可由下列方程式求出：

$$\pi = RTa \tag{10.36}$$

a 表示溶质的活度。请绘制 NaCl 溶液的浓度与渗透压之间的关系图。

10.13 已知下列半电池电位，

$$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O \qquad E_0' = 0.82V$$

$$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH \qquad E_0' = -0.32V$$

计算电子传递链的 $\Delta G^{0'}$ 值。

10.14 由 ADP 和磷酸合成 ATP 的 $\Delta G^{0'}$ 值为 30.5kJ mol^{-1}，假设每合成 1 摩尔 ATP 将有两个质子被线粒体 ATP 酶所传导，利用习题 10.7 的方程式（10.35）来计算合成 ATP 所需的最大的 $\Delta\mu$ 值。（提示：$\Delta\mu$ 的单位是 $kJmol^{-1}$，如何将它转换成 mV 的单位，以得出作为质子动势 Δp 的 $\Delta\mu$ 值?）

10.15 计算不同浓度的 Na_2SO_4 溶液的离子强度：（a）0.01 $molL^{-1}$；（b）0.05 $molL^{-1}$；（c）0.1 $molL^{-1}$；（d）1.0 $molL^{-1}$。

10.16 鸡肝中的丙酮酸羧化酶（见第12章）是一个由四个相同的亚基组成的低聚物。该酶被冷却至 277K 以下便会失去活性。假设酶活性的丢失预示四聚体解聚成了亚基，那么，在四聚体酶的亚基络合方面，焓和熵效应有何相对重要性？

10.17 （a）乙醇脱氢酶催化下列反应：

$$CH_3CH_2OH + NAD^+ \rightleftharpoons CH_3CHO + NADH + H^+$$

请推导出 ΔG^0 随 pH 变化的关系式。（b）已知该反应的 $\Delta G^{0'}$ 为 18.5$kJmol^{-1}$，pH=6（T=298 K）时 ΔG^0 为多少?

10.18 乙酸的电离式如下：

$$CH_3COOH \rightleftharpoons CH_3COO^- + H^+$$

已知 298 K 时 ΔG^0 和 ΔH^0 分别为 27.1kJmol^{-1}和 −0.39kJmol^{-1}。(a) 计算 298 K 时反应的 ΔS^0。(b) 估算反应在 323 K 时的平衡常数，可作任何必要的假设。

10.19　乙酰磷酸水解

$$\text{乙酰磷酸} \rightleftharpoons \text{乙酸} + \text{磷酸}$$

已知 298 K 时 ΔG^0 为 −42.3kJmol^{-1}。运用与例 10.10 相似的机理，从理论上解释下列哪个磷酸酯的水解反应可以用于合成乙酰磷酸?

(a)　1，3-二磷酸甘油酸⟶3-磷酸甘油酸 + 磷酸　($\Delta G^{0\prime} = -57$ kJmol^{-1})

(b)　磷酸肌酸⟶肌酸 + 磷酸　($\Delta G^{0\prime} = -42.7$ kJmol^{-1})

(c)　ADP⟶AMP + 磷酸　($\Delta G^{0\prime} = -27.6$ kJmol^{-1})

10.20　控制强度（C）描述了由代谢途径中酶活力的改变而引起的通量的相对变化情况。控制强度被定义为：

$$C_i = \frac{\partial \ln v_g}{\partial \ln v_i} = \frac{\partial v_g}{\delta v_i} \cdot \frac{v_i}{v_g} \tag{10.37}$$

v_g 表示流经代谢途径的净通量，v_i 是流经 E_i 酶催化的步骤的净通量。若酶的底物过量存在，则

$$C_i = \frac{[E_i]}{v_g} \cdot \frac{\partial v_g}{\partial [E_i]} \tag{10.38}$$

(提示：控制强度亦可表示成

$$C_i = v_i(\partial v_g/\partial p)/v_g(\partial v_i/\partial p)$$

p 是任意参数。底物浓度很高时，v_i 和 $[E_i]$ 之间有何关系?)

10.21　论证：在线型的序列反应中所有酶的控制强度的加和为 1。

11 糖代谢

11.1 糖酵解

糖酵解作用是使一分子葡萄糖转化成两分子丙酮酸的过程。糖酵解作用甚至可以在最简单的细胞中进行，并且不需要氧气，因此，它是最基本的代谢途径。细胞内的糖酵解作用有以下五大功能：

1. 将葡萄糖转化成丙酮酸，丙酮酸进入柠檬酸循环被氧化（见第 12 章）。
2. 使葡萄糖以外的很多化合物在中间阶段能够进入代谢途径。
3. 在某些细胞内此代谢途径被调整以便能够合成葡萄糖。
4. 糖酵解途径包含一些与旁路代谢反应相关的中间物。
5. 每消耗一分子的葡萄糖，则两分子 ADP 经过底物水平磷酸化作用而被磷酸化，产生两分子 ATP。

问题：糖酵解作用总的配平的化学方程式是什么?

$$\underset{\text{葡萄糖}}{C_6H_{12}O_6} + 2ADP + 2NAD^+ + 2Pi \longrightarrow \underset{\text{丙酮酸}}{2C_3H_4O_3} + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O$$

该反应式看似简单，而实际上却隐含糖酵解途径的复杂性，糖酵解途径包含有 9 个中间化合物和 10 个酶，酶都存在于细胞质中。

例 11.1

糖酵解作用的平衡反应式中，两分子的 NAD^+ 被转化成了两分子 NADH 和两个质子。NAD^+（烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）的结构式如图 11－1 所示。这是还原反应，辅酶 NAD^+ 接

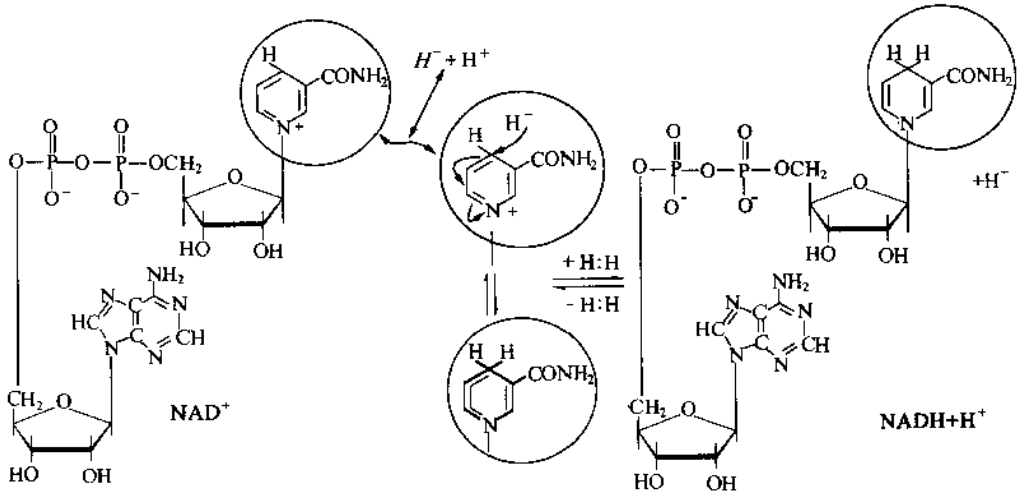


图 11－1　NAD^+ 和 NADH 的相互转化

受了等当量的 H^-（氢阴离子）。底物被氧化时，会失去 H:H 结构中的电子对，NAD^+ 的作用就是接受这些电子。NAD^+ 分子中接受 H^- 的相应部分是芳香族的吡啶环。还原过程完成后，即产生了 NADH 和 H^+；就好像 NAD^+ 接受 2H 被还原成 NADH 和 H^+，而 NADH 和 H^+ 给出 2H 被氧化成 NAD^+。

另外两个辅酶也能参与氧化还原过程；它们是黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（$NADP^+$），如图 11－2 所示。FAD 由于接受了 2H 而被还原成 $FADH_2$，而 $NADP^+$ 是接受了 H^- 才被还原成 NADPH 和 H^+ 的。这两个还原型辅酶也可以给出 H（或还原当量）而被氧化，与 NADH 的氧化过程相似。催化这些氧化还原反应的酶是有选择性的，在某一氧化状态下会选择特定的辅酶（NAD 或 NADP）。

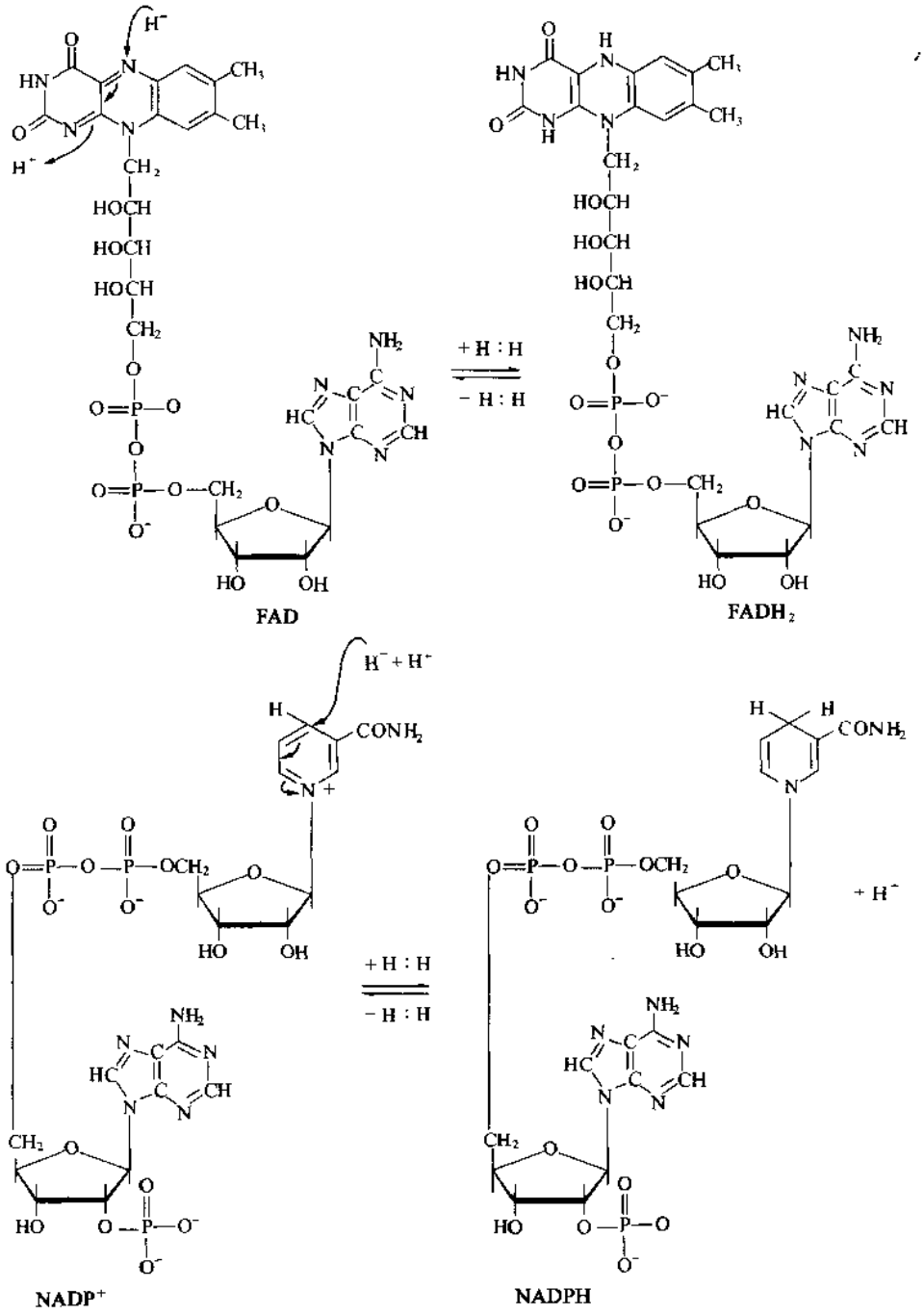
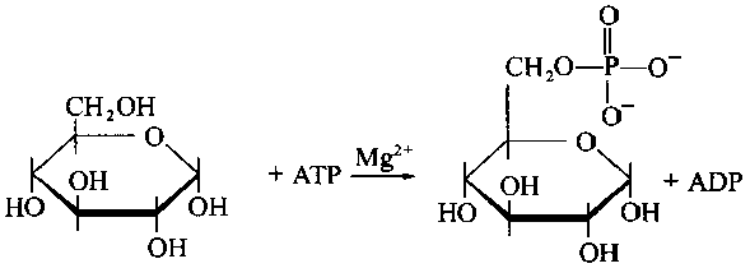


图 11－2　$FAD/FADH_2$ 和 $NADP^+/NADPH$ 的氧化还原反应

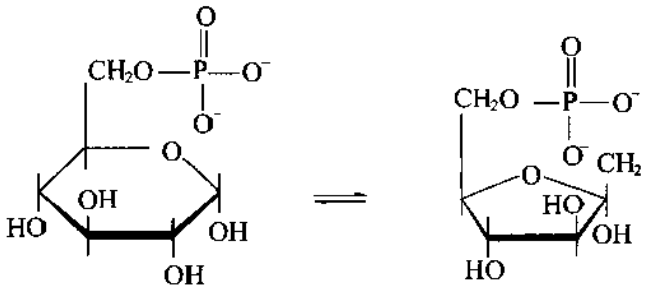
糖酵解过程的步骤如下：

1. α－D－葡萄糖被磷酸化为6－磷酸 α－D－葡萄糖。已糖激酶催化此反应，并需要 ATP 和 Mg^{2+} 的参与。



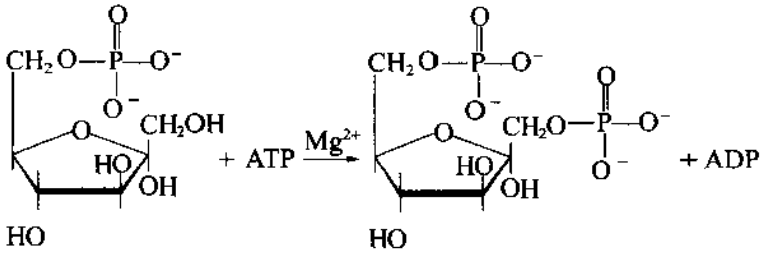
α-D-葡萄糖　　6－磷酸 α-D-葡萄糖

2. 在6－磷酸葡萄糖异构酶的作用下，6－磷酸 α－D－葡萄糖被异构化，成为6－磷酸 α－D－果糖。这是可逆反应。



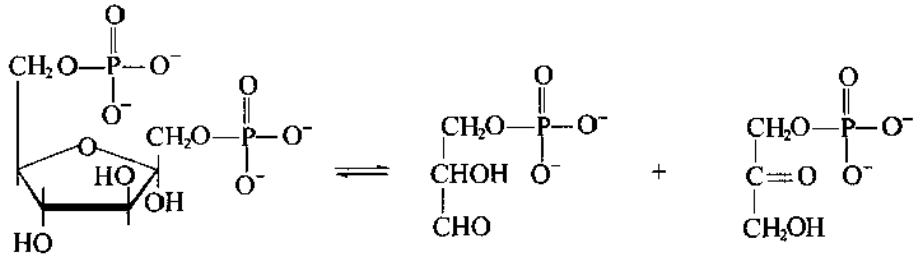
6-磷酸 α-D-葡萄糖　　6-磷酸α-D-果糖

3. 6－磷酸 α－D－果糖被磷酸化成1,6－二磷酸 α－D－果糖。反应由磷酸果糖激酶催化，并需要 ATP 和 Mg^{2+} 的参与。



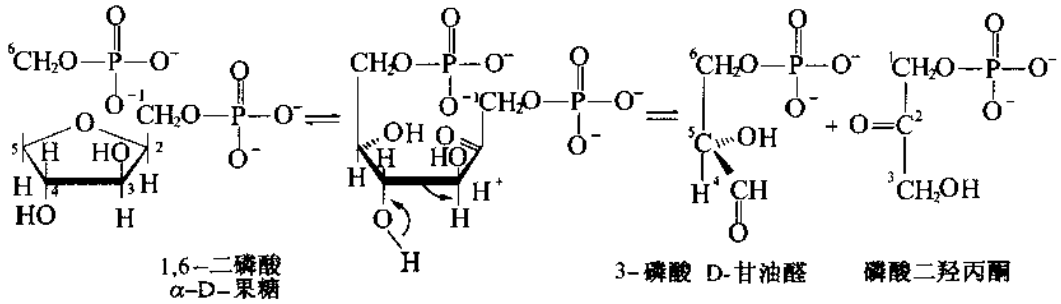
6-磷酸α-D-果糖　　1,6-二磷酸α-D-果糖

4. 1，6－二磷酸 α－D－果糖裂解。这是一个可逆反应，由1，6－二磷酸 α－D－果糖缩醛酶催化；此酶通常简称为缩醛酶。



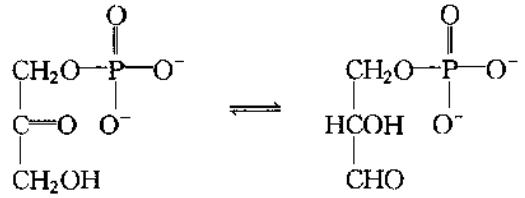
1,6-二磷酸 α-D-果糖　　3-磷酸 D-甘油醛　　磷酸二羟丙酮

由 1,6－二磷酸 α－D－果糖的开链式看出，第四步的反应机制是醛醇缩合反应。下面的反应式标明了两产物中碳原子的来源。



1,6－二磷酸 α-D-果糖　　3-磷酸 D-甘油醛　　磷酸二羟丙酮

5. 是异构化反应。在磷酸丙糖异构酶的催化下，磷酸二羟丙酮和 3－磷酸甘油醛可以相互转化。



磷酸二羟丙酮　　3－磷酸 D－甘油醛

由第四步和第五步综合起来看，一分子的1,6－二磷酸 α－D－果糖产生了两分子的 3－磷酸甘油醛。一分子葡萄糖转化成两分子 3－磷酸甘油醛的过程被称为是糖酵解途径的第一阶段，（第一步和第三步）需要两分子 ATP 供能。剩余的五步反应是糖酵解过程的第二阶段，这一阶段中每产生两个上述三碳化合物将由 ADP 生成两分子 ATP。

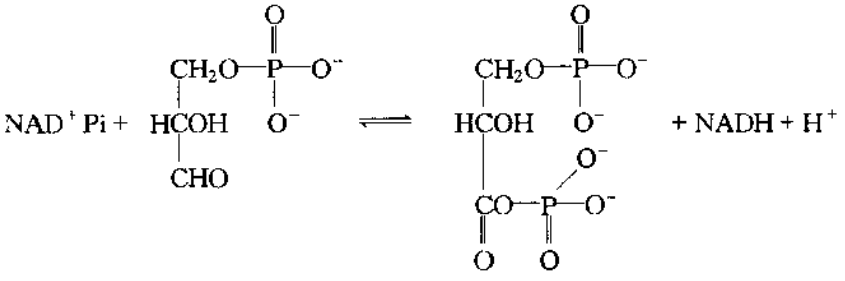
问题：糖酵解作用的总反应是如何使每一分子葡萄糖净生成两分子 ATP 的?

$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2NAD^+ + 2Pi \longrightarrow 2C_3H_4O_3 + 2ATP + 2NADH + 2H^+ + 2H_2O$$

在糖酵解过程的第一阶段中，一分子的葡萄糖生成了两分子的 3－磷酸甘油醛。在第二阶段中，每一分子的 3－磷酸甘油醛又可以产生两分子 ATP。因此，每一分子葡萄糖净生成两分子 ATP。

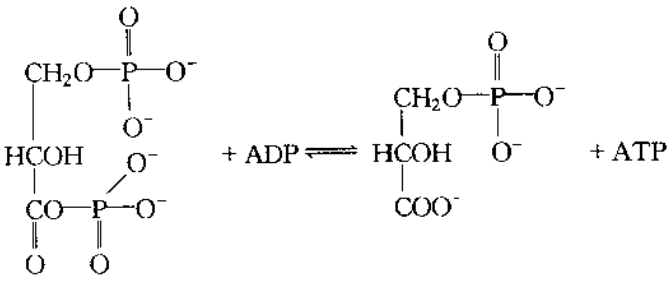
---

6. 3－磷酸甘油醛被氧化成1,3－二磷酸甘油酸，伴有羧酸的磷酸化。该反应由 3－磷酸甘油醛脱氢酶催化。



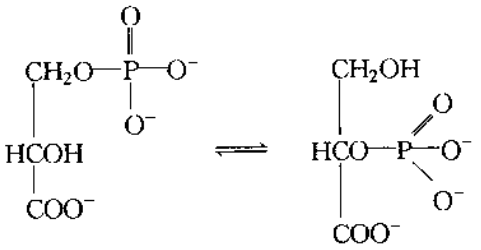
3－磷酸 D－甘油醛　　D－1，3－二磷酸甘油酸

7. 在磷酸甘油酸激酶的催化下，1,3－二磷酸甘油酸被转变成 3－磷酸甘油酸。这是一个产能反应，生成 ATP。



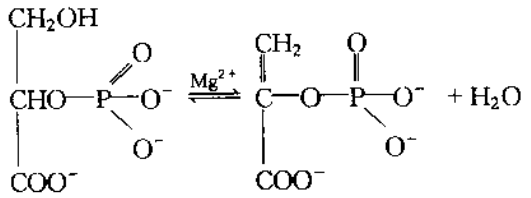
D-1，3-二磷酸甘油酸　　D-3-磷酸甘油酸

8. 在磷酸甘油酸变位酶的催化下，3-磷酸甘油酸异构化为2-磷酸甘油酸。



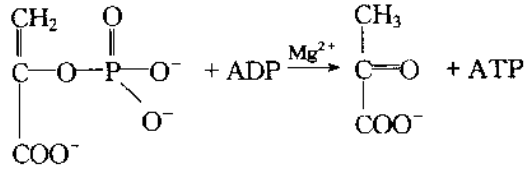
D-3-磷酸甘油酸　　D-2-磷酸甘油酸

9. 在烯醇化酶的催化下，2-磷酸甘油酸脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸。该反应需要 Mg^{2+} 的参与。



D-2-磷酸甘油酸　　磷酸烯醇式丙酮酸

10. 是糖酵解过程的最后一步。在丙酮酸激酶的催化下，磷酸烯醇式丙酮酸被不可逆地转变为丙酮酸。这是糖酵解过程中的第二个产能步骤，生成ATP，也需要 Mg^{2+} 的参与。



磷酸烯醇式丙酮酸　　丙酮酸

问题：糖酵解过程的第1，3，10步有什么共性？

这三个步骤都是不可逆的，是糖酵解作用的关键步骤。

例 11.2

有一些化合物可以抑制糖酵解途径中酶的活性。氟化物能抑制烯醇化酶，在体外，3-磷酸甘油醛脱氢酶可受碘代乙酰胺的抑制。有砷酸离子存在时，3-磷酸甘油醛脱氢酶可以催化3-磷酸甘油醛转变为砷酸磷酸甘油，砷酸磷酸甘油又可自发水解生成3-磷酸甘油酸与砷酸。虽然砷酸并不是酶的抑制剂，但却导致磷酸甘油酸激酶催化的反应无ATP生成。这便是砷酸中毒的反应之一。

糖酵解作用的能量学

一分子葡萄糖转变成两分子丙酮酸的过程是放能过程（见第10章）。将两

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_4O_3 \qquad \Delta G^{0'} = -147\ kJmol^{-1}$$

分子 ADP 底物水平的磷酸化过程与葡萄糖的降解过程偶联起来看，葡萄糖的自由能仍减少很多，虽然 ADP 的磷酸化是吸能反应：

$$ADP + Pi \longrightarrow ATP + H_2O \qquad \Delta G^{0'} = +30\ kJmol^{-1}$$

由于生成两分子 ATP 所需的自由能变化是 +60kJ，那么葡萄糖⟶2 个丙酮酸和 2ADP⟶2ATP 的偶联反应便是：

$$C_6H_{12}O_6 + 2Pi + 2ADP \longrightarrow 2C_3H_4O_3 + 2ATP + 2H_2O$$

$$\Delta G^{0'} = -147 + 60 = -87\ kJmol^{-1}$$

这意味着即使是与生成两分子 ATP 的吸能反应偶联在一起，葡萄糖向丙酮酸的转化反应仍然是可以进行的。

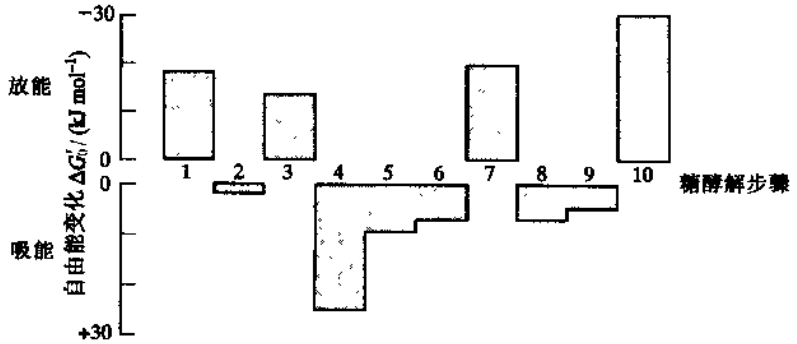


图 11-3　糖酵解反应的自由能

糖酵解过程中，有四个步骤是放能的，是易发生的反应（图 11-3），既包括 ATP 的水解过程（步骤 1 和 3），也包含 ATP 的生成过程（步骤 7 和 10）。虽然糖酵解的总反应过程倾向于丙酮酸的生成，但自由能的变化却并不很大。这提示不需要供给大量的能量即可使大部分步骤发生逆转。

若葡萄糖完全氧化成 CO_2：

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

标准自由能的变化为 −2 870 kJ mol^{-1}。与葡萄糖转化为丙酮酸的（$\Delta G^{0'} = -87$ kJ mol^{-1}）相比较，可以看出，丙酮酸生成过程放出的能量只相当于葡萄糖完全氧化的 3%。

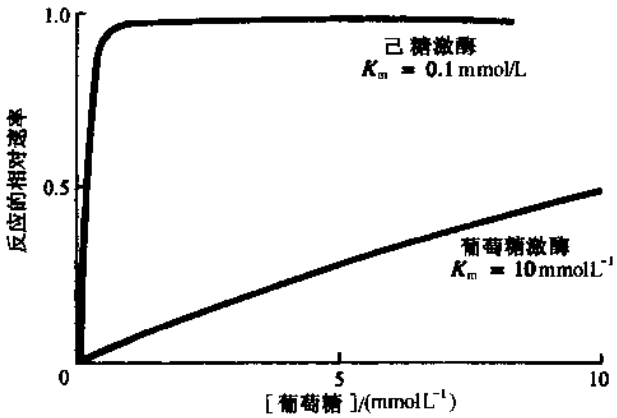


图 11-4　己糖激酶与葡萄糖激酶催化葡萄糖磷酸化速率随葡萄糖浓度变化的曲线。己糖激酶的 K_m 值远远小于葡萄糖激酶的

糖酵解过程的调控步骤

与所有的代谢途径一样，糖酵解过程的速率是受控制的。有三个控制步骤。

第一调控步骤

糖酵解过程的第 1 步便是其第一调控步骤。这一步中，在己糖激酶的催化下，葡萄糖被转化为 6-磷酸葡萄糖。己糖激酶存在于所有的细胞中，能够催化很多己糖及己糖衍生物的磷酸化反应，并非葡萄糖的特异性酶。己糖激酶的活性受其产物 6-磷酸葡萄糖浓度的调控；这一过程被称为产物

抑制作用。在哺乳动物细胞内，这样的调节功能有两个目的。①如果细胞内有足够的6-磷酸葡萄糖供给能量需求，那么在这一细胞内后续的葡萄糖磷酸化作用将被减弱。②如若葡萄糖供给不断，则在其清除速率（将它转化为6-磷酸葡萄糖）降低后，血糖浓度会增高。这便使得葡萄糖更有利于被另一个磷酸化酶，葡萄糖激酶所利用。葡萄糖激酶是葡萄糖的特异性酶，仅存在于肝脏中，同样能够催化葡萄糖成为6-磷酸葡萄糖。图11-4给出了己糖激酶（存在于所有细胞中）与葡萄糖激酶（仅存于肝细胞中）的相对活力。

正常情况下，所有细胞都可以从血液中获取葡萄糖。己糖激酶的低 K_m 值（$0.1 mmol L^{-1}$）提示即使血液葡萄糖浓度较低，其也能快速进入细胞并被转化为6-磷酸葡萄糖，再进入糖酵解途径。由于细胞需要能量，因此6-磷酸葡萄糖浓度会增高，从而减弱己糖激酶活力。若血糖浓度大量升高（如摄取高糖饮食后），则肝脏葡萄糖激酶活力提高以维持葡萄糖流通。因为己糖激酶已完全被葡萄糖所饱和，但葡萄糖激酶只有在葡萄糖浓度大于其 K_m 值（$10 mmol L^{-1}$）时才能以接近最大反应速率的状态发挥作用。此外，葡萄糖激酶不受6-磷酸葡萄糖的抑制。这两个酶的相互影响确保了葡萄糖过剩时可在肝脏内被转化成6-磷酸葡萄糖。

第二调控步骤

糖酵解途径的第三步，由磷酸果糖激酶催化的6-磷酸果糖向1,6-二磷酸果糖的转化，是第二调控步骤。

问题：哪个酶是调控糖酵解途径的关键酶？

磷酸果糖激酶是糖酵解途径的关键酶，是一个变构酶，活性受多种与能量传导相关的因素的调节。

ADP或AMP可以提高磷酸果糖激酶的活性，而ATP、NADH、柠檬酸、长链脂肪酸则是抑制其活性。当细胞处于低能状态时，与正常状态时的相比，ADP和AMP的量多，而ATP的量少。这种情况下，磷酸果糖激酶被激活，与底物6-磷酸果糖的亲和力较高（图11-5）。当细胞处于高能状态时，则是ATP的量多，而ADP和AMP的量少。在这种情况下，ATP与磷酸果糖激酶的调节位点相结合，引起其反应速度曲线由双曲线变成S形，酶与底物的亲和力降低，反应速度下降。

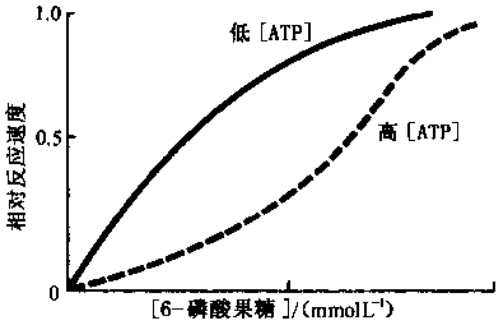


图11-5 在高或低浓度ATP存在时，磷酸果糖激酶催化6-磷酸果糖磷酸化的速率图

问题：柠檬酸、NADH和长链脂肪酸都能抑制磷酸果糖激酶的活性。那么这些物质的量是通过哪些步骤被提高的？它们作用的意义何在？

胞浆内NADH的生成是在糖酵解途径的第六步，高浓度的此还原产物暗示细胞处于高能状态；因而葡萄糖的降解速率不会提高。大量的长链脂肪酸是由甘油三酯（见第13章）降解产生的，而柠檬酸则是部分氨基酸（见第15章）的降解产物。这些物质有利于三羧酸循环中的氧化反应，所以，为了储存葡萄糖而抑制磷酸果糖激酶。

第三调控步骤

糖酵解途径的第十步，由丙酮酸激酶催化的磷酸稀醇式丙酮酸向丙酮酸的转化过程是第三调控步骤。1,6-二磷酸果糖和磷酸稀醇式丙酮酸是丙酮酸激酶的激活剂，ATP、柠檬酸和长链脂肪酸是它的抑制剂。这表明丙酮酸激酶受调节的方式类似于磷酸果糖激酶；在细胞处于高能状态或能得到替代葡萄糖的燃料时，这两种酶均受抑制。另外，与磷酸稀醇式丙酮酸（丙酮酸激酶的底物）一样，1,6-二磷酸果糖（磷酸果糖激酶催化的反应产物）也能激活丙酮酸激酶。这都是类似于电子电路系统的正前馈控制的实例。低水平的 ATP 使磷酸果糖激酶被激活，产生丙酮酸激酶的第一个激活剂（1,6-二磷酸果糖），最终该激活剂又被转变为丙酮酸激酶的第二个激活剂（磷酸稀醇式丙酮酸）。这两种能加速糖酵解的酶之间的协同作用随着酶结合底物能力的变化也可阻碍反应进程。ATP 浓度增高时，这两种酶都受抑制。磷酸果糖激酶活力降低则 6-磷酸果糖浓度上升，又由于 6-磷酸果糖与 6-磷酸葡萄糖可以相互转化（通过 6-磷酸葡萄糖异构酶的作用），引起 6-磷酸葡萄糖的增多，最终抑制己糖激酶（图 11-6）。

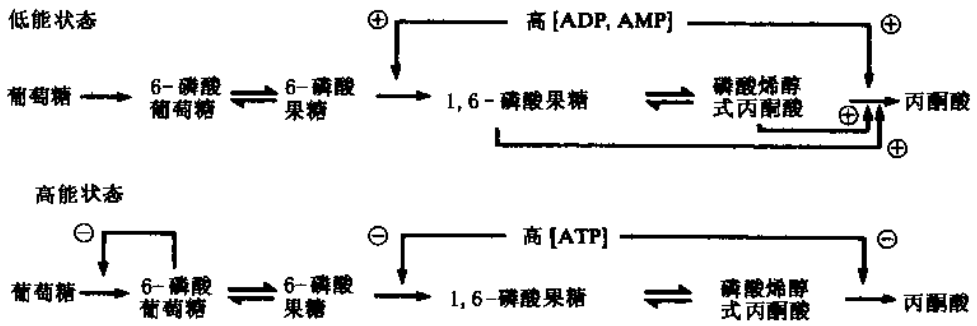


图 10-6　糖酵解途径的调控。⊕=活化作用；⊖=抑制作用

不仅仅是糖酵解过程受己糖激酶、磷酸果糖激酶、丙酮酸激酶的调控，若细胞处于高能状态，或胞内葡萄糖量充足，或两种情况兼而有之，过剩的葡萄糖不被组织降解，而是被肝内的葡萄糖激酶有选择地捕获，合成糖原储存在肝脏中（见 11.5）。

11.2　丙酮酸的去向

所有细胞内都会发生由一分子葡萄糖生成两分子丙酮酸的反应。这一过程有三个重要的特性：①不需要氧的参与；②经底物水平的磷酸化作用，两分子 ADP 被磷酸化；③两分子 NAD^+ 被还原。细胞内丙酮酸的去向与以下三个条件相关。①氧的可获得性；②胞内的能量状况；③NADH 被氧化成 NAD^+ 的机制。

问题：为什么糖酵解途径中产生的 NADH 必须被氧化成 NAD^+ 才能被再循环利用？

3-磷酸甘油醛脱氢酶催化的反应（糖酵解途径的第六步）需要 NAD^+ 的参与，因而，NAD^+ 不仅是该步骤的，也是糖酵解作用能够顺利进行的基本要素。细胞中不含高浓度的 NADH 或 NAD^+；它们在机制上必须能够相互转化，以便被它们参与的反应所利用。

还有一个控制丙酮酸去向的条件是产生丙酮酸的细胞的类型，因为一些细胞（如血红细胞）缺乏将丙酮酸彻底氧化为 CO_2 的代谢能力。

丙酮酸彻底氧化为 CO_2

一摩尔的葡萄糖完全氧化为 CO_2，释放出 2 870 kJ 自由能。而在一摩尔葡萄糖转化为两摩尔丙酮酸的过程中，仅能释出上述能量的 3%，仅产生两摩尔 ATP。若可将丙酮酸彻底氧化为 CO_2，细胞还是可以利用大部分其余能量的。

丙酮酸完全氧化的化学反应为：

$$C_3H_4O_3 + 2\frac{1}{2}O_2 \longrightarrow 3CO_2 + 2H_2O$$

此反应式实际上表达了两个氧化反应过程，第一个是丙酮酸在三羧酸循环（见第 12 章）内被氧化为 CO_2：

$$C_3H_4O_3 + 3H_2O \longrightarrow 3CO_2 + 10H$$

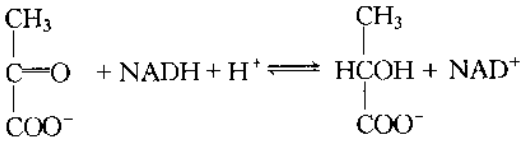
该反应中，一分子丙酮酸生成了 10 倍量的 H，还有一分子 ADP 被直接磷酸化。第二个反应是：

$$10H + 2\frac{1}{2}O_2 \longrightarrow 5H_2O$$

描述的是 10 个 H 在电子传递链（见第 14 章）中的氧化过程，伴有 14 分子 ADP 的磷酸化。这是由氧化磷酸化作用而引起的磷酸化。结果，由于被彻底氧化为 CO_2，一分子丙酮酸导致了 15 分子 ADP 的磷酸化。葡萄糖被降解为 2 分子丙酮酸时，只生成 2 分子 ATP，而 2 分子丙酮酸却能产生 30 分子的 ATP。产生 ATP 要依赖两个因素：①细胞必须能够进行柠檬酸循环和电子传递；②必须有氧的供给。若缺少任何一个因素，都不能产生 30 分子的 ATP。如，哺乳动物的细胞中，血红细胞是不能进行柠檬酸循环和电子传递的，因为它不含线粒体。激烈活动时，骨骼肌完全氧化丙酮酸的能力有限，也是因为骨骼肌细胞内的线粒体比其他细胞的少得多，所以，肌肉活动产生的丙酮酸不能被完全氧化掉。

丙酮酸转化成乳酸

如果细胞缺乏氧化丙酮酸的能力，那么，ATP 的生成会使糖酵解过程受到限制。若细胞能获得足够的葡萄糖，在有 ADP、NAD^+ 和 Pi 存在时，丙酮酸则可被分解掉。所有细胞内都有足够的 ATP 的水解产物 ADP 和 Pi，但 NAD^+ 的量却有限。糖酵解过程中只有第六步是氧化反应，3-磷酸甘油醛被氧化成1,3-二磷酸甘油酸，同时 NAD^+ 被还原成 NADH。为了糖酵解过程能够继续进行，NADH 必须被再氧化为 NAD^+。在血红细胞和活化的肌细胞中，NADH 的再氧化是通过丙酮酸被还原为乳酸的反应来完成的，乳酸经特异的膜转运蛋白而弥散出细胞。该反应由乳酸脱氢酶催化：



丙酮酸　　乳酸

任何哺乳动物细胞都含有乳酸脱氢酶，其活性随组织的不同而不同。因为此酶有五种被称为同工酶的类型，每一种都对丙酮酸有明显不同的 K_m 值。每一个乳酸脱氢酶同工酶都由四个亚基组成，亚基有 M、H 两类。五种乳酸脱氢酶同工酶分别是 M_4、M_3H、M_2H_2、MH_3 和 H_4。同工酶 M_4 对丙酮酸虽有较大的 K_m 值（亲和力低），但转化数几乎为 H_4 的两倍。这表明丙酮酸浓度较高时，M_4 转化丙酮酸为乳酸的速率要比同等量 H_4 的大得多。虽然同工酶 H_4 对丙酮酸有较小的 K_m 值（亲和力高），但由于转化数低，结果在丙酮酸浓度较高时，其转化丙酮酸为乳酸的速率比同等量 M_4 的小。另外，H_4 的活性会受高浓度丙酮酸的抑制。其他几个同工酶的受抑制程度介于这两种酶之间。很多细胞含有的五种乳酸脱氢酶同工酶的量有所不同，如，骨骼肌细胞中以同工酶 M_4 为主，而心肌细胞中以同工酶 H_4 为主。实际

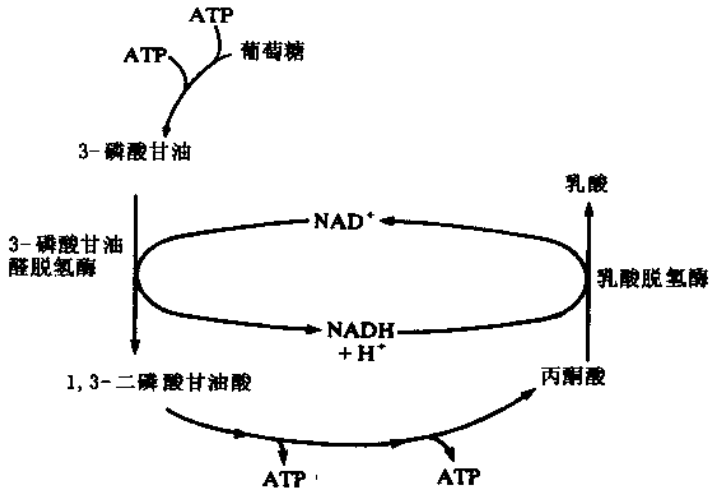


图 11－7　3－磷酸甘油醛脱氢酶和乳酸脱氢酶催化的反应之间的互辅关系图

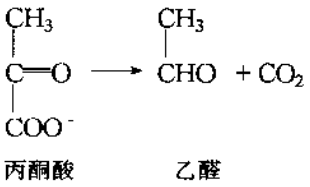
上，心肌细胞中同工酶 H_4 对丙酮酸的低转化数和其受丙酮酸的抑制作用，与细胞倾向于将丙酮酸氧化为 CO_2 是一致的；与此所不同的是，在活化的骨骼肌细胞中，倾向于将丙酮酸氧化为乳酸。

肝细胞能将丙酮酸氧化为 CO_2，且肝细胞内的乳酸脱氢酶又是以对丙酮酸亲和力低的同工酶 M_4 为主的。因此，乳酸由血液进入肝脏后，被迅速转化为丙酮酸。

图 11－7 是被称为乳酸发酵的代谢图。两个脱氢酶，3－磷酸甘油醛脱氢酶与乳酸脱氢酶之间的辅反应物循环，确保了氧化态 NAD^+ 的再生成，以便糖酵解过程、乳酸发酵过程和 ATP 生成过程能够继续进行。

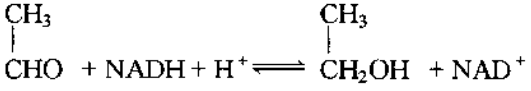
丙酮酸转化为乙醇

丙酮酸还有另一个不太重要的去路，该过程不发生在哺乳动物组织中。一些有机体能在有氧或无氧条件下生存，被称为兼性厌氧菌，它们能够调节自身的代谢以适应有氧或缺氧环境。最重要的兼性厌氧菌是酵母菌。酵母菌可将葡萄糖氧化为丙酮酸，然后在有氧条件下，再把丙酮酸氧化为 CO_2。若在缺氧条件下，则启动 NAD^+ 的再生途径。酵母菌中不含乳酸脱氢酶，但包含不存在于哺乳动物细胞中的丙酮酸脱羧酶。此酶催化丙酮酸向乙醛的转化反应：



丙酮酸　　乙醛

而后，再经含 Zn 的乙醇脱氢酶的催化，乙醛被还原为乙醇。



乙醛　　乙醇

乙醇发酵过程的最后一步与乳酸发酵过程的相似。这两个反应都能再产生 NAD^+，及生成低分子量的、水溶的、可弥散出细胞代谢终产物。在乙醇发酵的过程中，第二步反应是可逆的，对于厌氧酵母菌细胞，若能获得氧，则乙醇被氧化为乙醛。乳酸发酵过程中乳酸可以被氧化成丙酮酸，而乙醇发酵与此不同，不能由乙醛生成丙酮酸。但乙醛却可以被转化为乙酸，最终在三羧酸循环中被彻底氧化为 CO_2。乙酸的氧化生成了 8 个 H，这生 8 个 H 在氧化磷酸化（见第 14 章）过程中可产生 ATP：

$$CH_3COOH + 2H_2O \longrightarrow 2CO_2 + 8H$$

$$8H + 2O_2 \longrightarrow 4H_2O$$

总反应式为：

$$CH_3COOH + 2O_2 \longrightarrow 2CO_2 + H_2O$$

11.3 糖异生

问题：前面已经叙述了组织可以分解葡萄糖，那么是否也可以合成葡萄糖呢？

是的，但只有部分组织有合成葡萄糖的能力。

哺乳动物细胞中，葡萄糖是最丰富的碳水化合物的能量源。葡萄糖可以作为糖酵解的燃料在任意细胞内被代谢，也可以作为糖原聚合物被储存在肝脏和肌肉中。有些组织含有的酶在一定条件下能催化葡萄糖的合成。合成葡萄糖所需的条件是：①碳骨架（不同类型的碳架结构）的可获得性；②反应需要的、以 ATP 形式储存的能量；③能催化反应的酶。

用于合成葡萄糖的碳骨架并非直接来源于碳水化合物，是由特定的氨基酸衍生而来的。只有乳酸的碳架是例外，乳酸本身是糖代谢的产物，也能被结合成新的葡萄糖分子。由非糖的前体化合物合成新的葡萄糖分子的过程，称为糖异生作用。

问题：糖酵解途径可以反向进行吗？即丙酮酸可以被转化为葡萄糖吗？

由于糖酵解途径中有三个不可逆步骤，因此无法直接逆向进行，但通过附加一些反应，丙酮酸可以被转化为葡萄糖。

糖酵解途径中的三个不可逆步骤分别是由己糖激酶（肝脏中为葡萄糖激酶）、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶催化的。能进行糖异生作用的组织都包含可使这三步反应逆向进行的酶。这样的话，通过糖酵解途径的其他步骤的碳原子的净通量是可逆的。图11－8给出了糖异生作用和糖酵解作用的简要过程。丙酮酸被转化为葡萄糖时，经糖酵解途径净逆转，将有三个非糖酵解步骤发生。

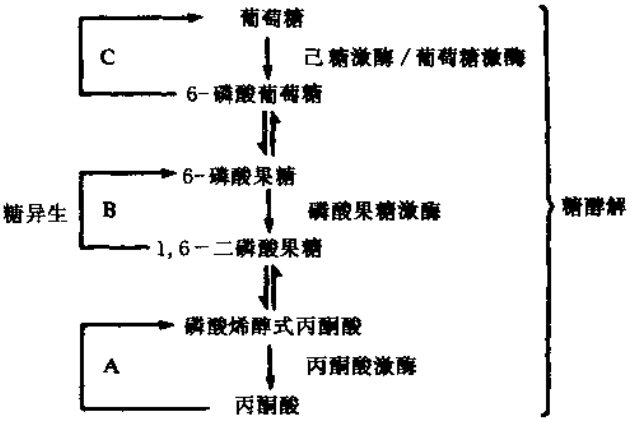
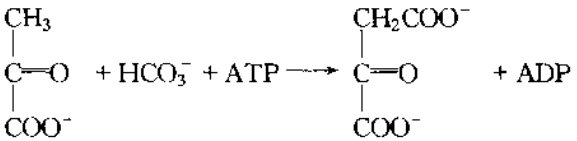


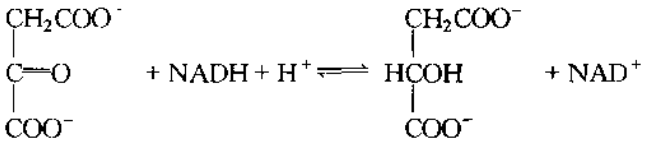
图 11－8 糖异生作用和糖酵解作用。
A，B，C 表示糖异生过程的步骤，
绕过了（糖酵解净通量反方向的）不可逆反应

A 步骤，丙酮酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸，是通过一个迂回过程完成的。首先丙酮酸进入线粒体，因为糖异生作用必须在高能状态下才能进行。在此条件下，线粒体丙酮酸羧化酶催化丙酮酸转化为草酰乙酸：



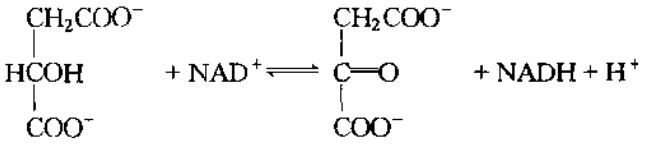
丙酮酸　　草酰乙酸

丙酮酸羧化酶是受乙酰－CoA 调节的变构酶，与 Mg^{2+} 离子和辅基生物素结合在一起。线粒体处于高能状态时，乙酰－CoA 和 ATP 的浓度也相对较高，即酶的调节剂和能量的可得性较高。随后，草酰乙酸在线粒体内被转化为苹果酸：



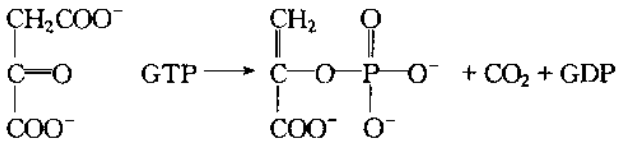
草酰乙酸　　苹果酸

后续的反应是在细胞液中进行的。苹果酸借助于二羧酸载体被转运入细胞液中，并需要有Pi或二羧酸阴离子的介入。二羧酸载体只对苹果酸、琥珀酸和延胡索酸有特异性。随后，经胞浆苹果酸脱氢酶的催化，细胞液内的苹果酸又转变成草酰乙酸：



苹果酸　　草酰乙酸

由于没有直接的机制，所以上述两个反应对于将草酰乙酸从线粒体内转运入细胞液内是必要的。随后，细胞液内的草酰乙酸被不可逆地转化为磷酸烯醇式丙酮酸，此过程需要磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的催化，而该酶只有在ATP浓度较高时才起作用：



草酰乙酸　　磷酸烯醇式丙酮酸

以上四步反应将丙酮酸转化为了磷酸烯醇式丙酮酸（图11－8中的步骤A），并且绕过了糖酵解途径中由丙酮酸激酶催化（第10步）的不可逆反应。

糖酵解第9步向第4步的逆向反应是需要消耗能量才能完成的，而第7步却能生成ATP。换句话说，细胞只有在具有相对高的自由能的情况下才能发生净糖异生作用。高能量状态还提示NADH的浓度亦较高；这确保了糖酵解途径的第6步即3－磷酸甘油醛脱氢酶催化1，3－二磷酸甘油酸转化成3－磷酸甘油醛（图11－9）的逆向进行。

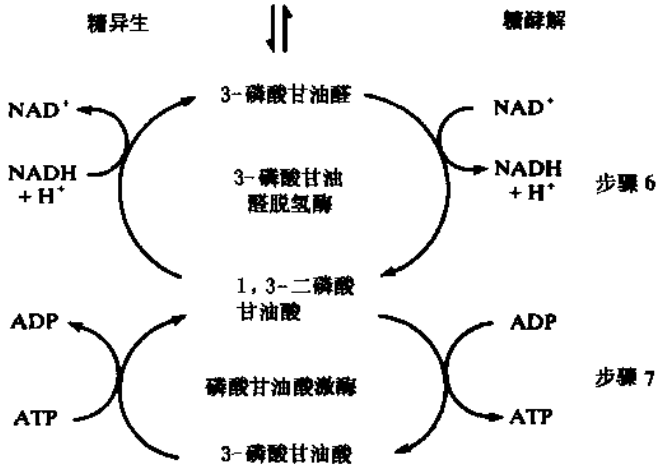
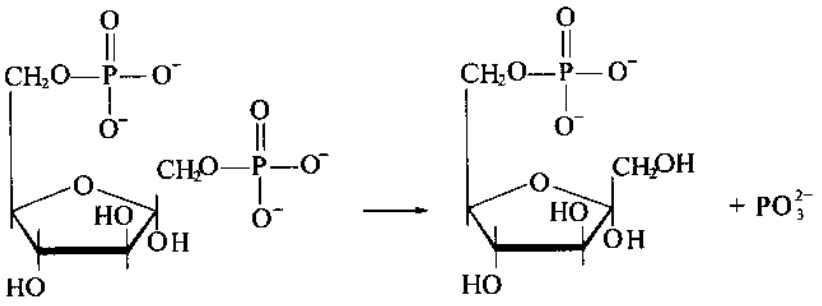


图11－9　糖酵解过程第6、7步的逆反应可在高能状态下进行

糖酵解途径的第4步逆向进行的结果是，两分子丙酮酸被缩合生成一分子1,6－二磷酸果糖。此化合物是糖酵解途径中不可逆的第3步反应的产物。能进行葡萄糖异生作用的细胞中包含能催化该逆反应（见313页）的果糖-1,6－二磷酸酶。



1,6- 二磷酸果糖　　6-磷酸果糖

果糖-1，6-二磷酸酶被 AMP 抑制，但可被柠檬酸和 3-磷酸甘油酸激活。因此，在高键能状态下，柠檬酸的增多与 AMP 的减少结合在一起便可激活果糖-1,6-二磷酸酶，抑制磷酸果糖激酶（图 11-10）。从而促进1,6-二磷酸果糖水解成 6-磷酸果糖。

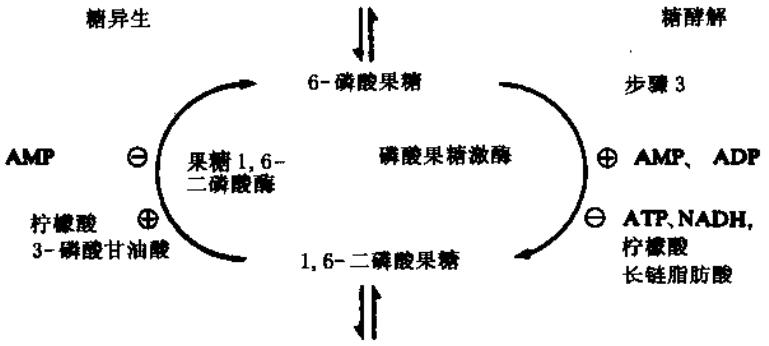
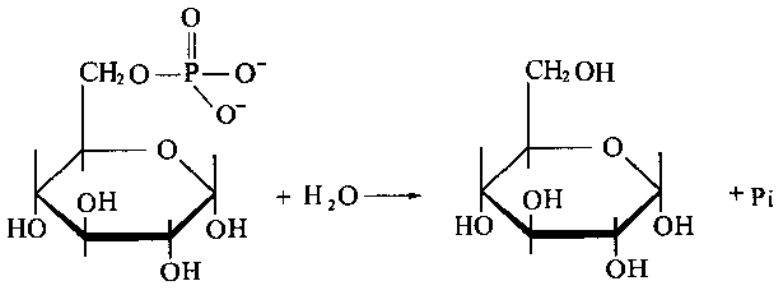


图 11-10　糖酵解过程第 3 步的逆反应可在高能状态下进行⊕=激活；⊖=抑制

在 6-磷酸葡萄糖异构酶的催化作用下，6-磷酸果糖被转化成 6-磷酸葡萄糖。葡萄糖激酶（仅存于肝脏中）和己糖激酶能催化葡萄糖生成 6-磷酸葡萄糖，但不能催化此反应的逆过程，然而肝脏中有一种特殊的酶，葡萄糖-6-磷酸酶，可以催化 6-磷酸葡萄糖水解为葡萄糖。随后，生成的葡萄糖进入血液。



6-磷酸葡萄糖　　葡萄糖

6-磷酸葡萄糖的另一代谢途径是在肝脏和肌肉以糖原的形式储存起来（糖原的生成过程将在 11.5 中讨论）。

总之，在肝脏和肾脏中可由乳酸与非糖前体化合物（由特定氨基酸衍生出碳）来合成葡萄糖。合成过程基本上是通过糖酵解途径的逆反应完成的，因为肝肾细胞内包含有能克服三个不可逆糖酵解步骤的酶。

11.4 Cori 循环

一些特异酶仅存在于某些细胞中，这意味着一些器官必须依赖于其他器官来完全代谢其

特有的底物。就糖而言，肝脏与骨骼肌显示了特殊的代谢协同作用。运动过程中，骨骼肌所获取的 ATP 几乎完全来自糖酵解作用。结果，代谢的终产物乳酸，进入血液中。血液流经肝脏时，通过乳酸脱氢酶同工酶 M_4 的作用，乳酸被清除掉，因为该酶可迅速地将乳酸转化为丙酮酸。由于肝细胞通常都是在高能状态下，所以大部分丙酮酸被糖异生途径转化为 6-磷酸葡萄糖。而后，6-磷酸葡萄糖被葡萄糖-6-磷酸酶水解为葡萄糖，进入血液，再随血液被转运到骨骼肌。在骨骼肌中葡萄糖又被己糖激酶所催化，转化成 6-磷酸葡萄糖，从而进入糖酵解途径。整个过程（图 11-11）被称为 Cori 循环，该循环的发现者，Carl 和 Gerty Cori 于 1937 年获诺贝尔奖。

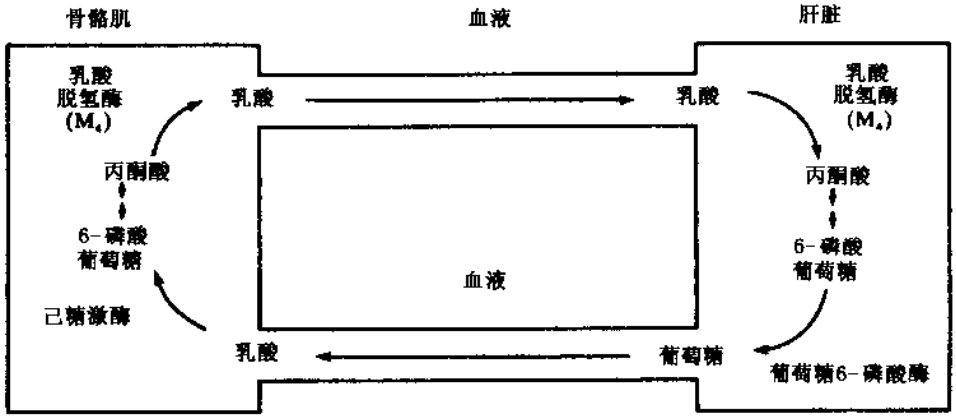


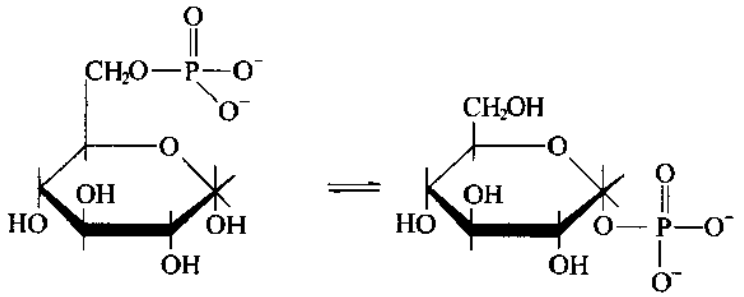
图 11-11　Cori 循环

11.5　糖原代谢

糖原的合成

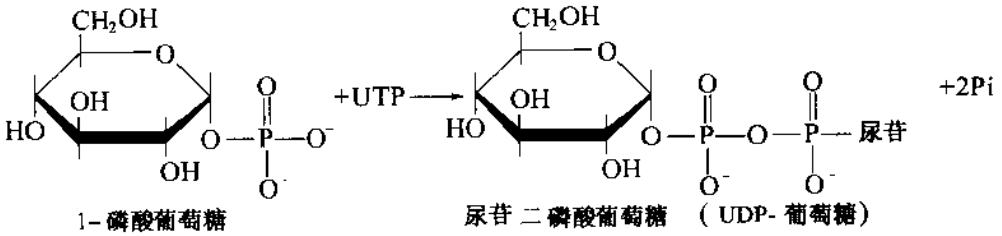
在肝脏和肌肉中，糖原可由 6-磷酸葡萄糖来合成，并以糖原颗粒储存在这些组织中。作为葡萄糖聚合物的糖原，是能量的储存，能很快地被分解为 6-磷酸葡萄糖，进入糖酵解途径。若所有组织中糖原合成的机制是一样的，那么就要考虑 6-磷酸葡萄糖的来源。肝脏中，6-磷酸葡萄糖既可以来源于血糖，也可来源于糖异生作用。而骨骼肌中，6-磷酸葡萄糖只能来源于血糖。

糖原合成的第 1 步是 1-磷酸葡萄糖的生成，由磷酸葡萄糖变位酶催化：



6-磷酸葡萄糖　　1-磷酸葡萄糖

随后，1-磷酸葡萄糖被激活，以便能够被连接成糖原。激活作用要消耗能量，能量则来源于 UDP-葡萄糖焦磷酸酶催化的尿苷三磷酸（UTP）的水解作用。



问题：UDP-葡萄糖中两个磷酸基团的出处是哪里？

一个来自于1-磷酸葡萄糖，另一个来自于尿苷酸（UMP）。在焦磷酸酶的催化下，自UTP末端磷酸释出的焦磷酸被水解为无机磷酸。这个水解过程是不可逆的，促使了UDP-葡萄糖的合成。

被修饰了的葡萄糖分子成为糖原合成酶的底物：

$$(\text{葡萄糖})_n + \text{UDP-葡萄糖} \longrightarrow (\text{葡萄糖})_{n+1} + \text{UDP}$$

葡萄糖单位是以特殊的方式加到葡萄糖聚合链上的；即：只有糖原末端葡萄糖单位C-4上的羟基与UDP-葡萄糖 α 异构体C-1上的氧之间形成酯键（图11-12）。所形成的键是 $\alpha(1\rightarrow4)$ 键（见第2章）。另外，糖原还有由 $\alpha(1\rightarrow6)$ 键连接而成的支链。淀粉-（1，4→1，6）转葡萄糖基酶可以催化糖原中6或7个葡萄糖残基的片段转移到同糖原分子中的另一个葡萄糖残基的C-6羟基上（图11-13）。

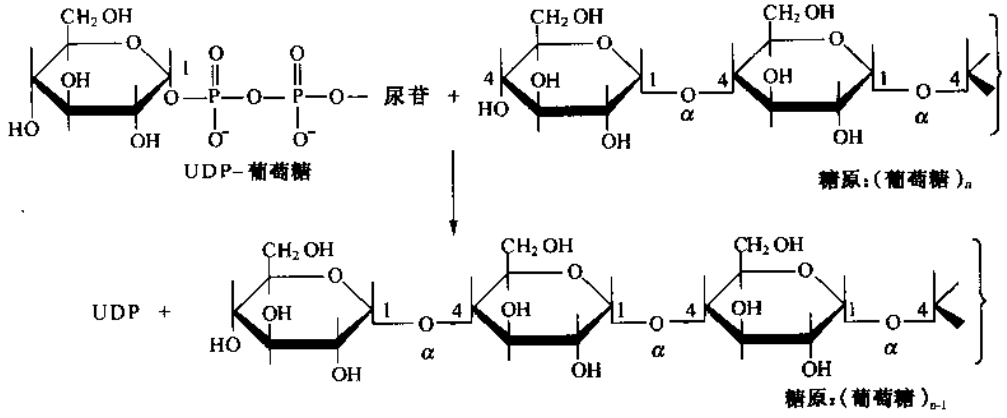


图11-12 糖原分子上一个葡萄糖单位的添加

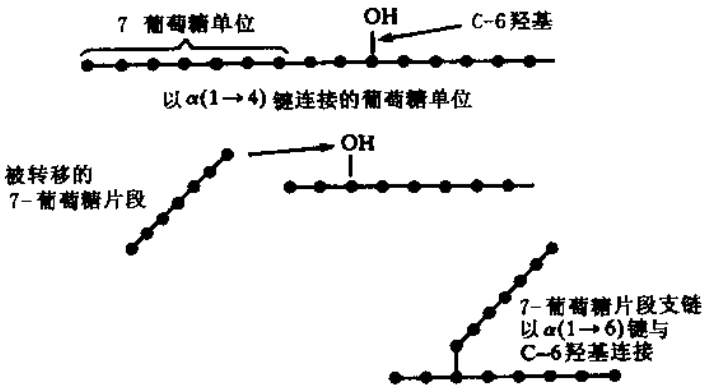
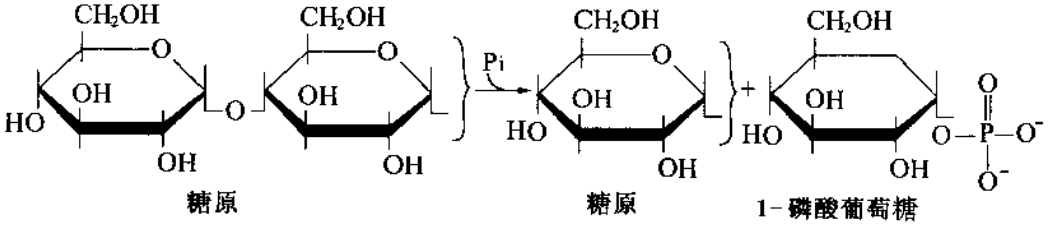


图11-13 糖原分子中支链葡萄糖残基的形成 ⟝ = 葡萄糖残基

糖原分子中支链的生成使得聚合物的结构更加紧凑，可溶性也更好，还产生了更多的末端葡萄糖残基。末端葡萄糖残基的增多对于糖原的降解是非常重要的，因为降解过程是从聚合物的末端葡萄糖残基开始逐步裂解的。

糖原的降解（糖原分解）

糖原通过不同于其合成的途径被降解为 6 -磷酸葡萄糖。第 1 步是，在无机磷酸的参与下，糖原磷酸酶催化末端$\alpha(1\rightarrow4)$糖苷键的断裂，产生少一个残基的糖原和一分子 1 -磷酸葡萄糖。



葡萄糖磷酸酶不能切断$\alpha(1\rightarrow6)$糖苷键，需要有另一个酶，$\alpha(1\rightarrow6)$葡萄糖苷酶来水解此键；并且$\alpha(1\rightarrow6)$葡萄糖苷酶还可以使糖原磷酸酶更易水解$\alpha(1\rightarrow4)$糖苷键。生成的1 -磷酸葡萄糖经磷酸葡萄糖变构酶的作用转化为 6 -磷酸葡萄糖。6 -磷酸葡萄糖的去向取决于它是在骨骼肌细胞内产生的，还是在肝细胞内产生的。若在骨骼肌细胞中，6 -磷酸葡萄糖将进入糖酵解途径，在肝细胞中，6 -磷酸葡萄糖既可进入糖酵解途径，也可被葡萄糖 6 -磷酸酶转化为葡萄糖。

糖原合成与降解的调控

糖原的合成与降解受很多因素的控制。其中，糖原合成酶和糖原磷酸酶是变构调控的，活性受 6 -磷酸葡萄糖的调节；当 6 -磷酸葡萄糖浓度较高时，糖原合成酶被激活，则糖原的合成作用超过降解作用。高浓度的 6 -磷酸葡萄糖抑制了糖原磷酸酶的活性，因此糖原降解作用受到阻碍（图 11 - 14）。糖原分解的另一个调控步骤是肾上腺素和胰高血糖素介导的（见 11.9）。

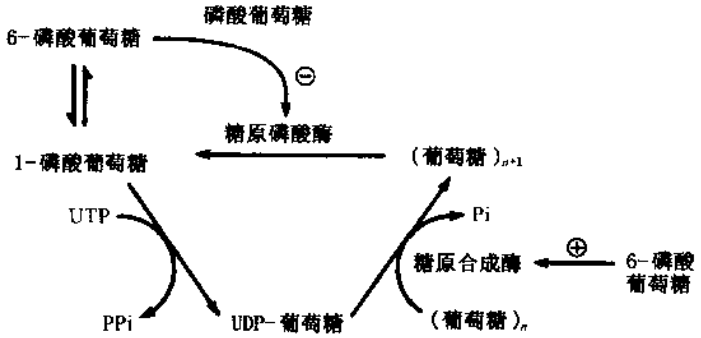


图 11 - 14　糖原的合成与降解。⊕ = 激活；⊖ = 抑制

11.6　进入糖酵解途径的其他碳水化合物

糖酵解作用被定义为是一分子葡萄糖转化为两分子丙酮酸的过程。然而，很多的碳水化合物都可以通过糖酵解途径而将包含在其结构中的碳架和键能用于细胞的代谢。如此，这些碳水化合物最终可被转化成丙酮酸或葡萄糖，或以糖原形式被储存。

例 11.3

糖原降解为 1 -磷酸葡萄糖是多糖进入糖酵解途径的范例，因为 1 -磷酸葡萄糖可被转化为 6 -磷酸葡萄糖。另一个可将其碳水化合物组成单元用于糖酵解途径的多糖是淀粉。淀粉是植物葡萄糖的储存形式，结构与糖原相似，是葡萄糖以$\alpha(1\rightarrow4)$糖苷键和$\alpha(1\rightarrow6)$糖苷键聚合的多聚物，其中$\alpha(1\rightarrow6)$糖苷键比糖原中的要少。淀粉是两种葡萄糖聚合物的混合物：一种是没有支链的，称为直链淀粉，另一种是有支链的，称为支链淀粉。消化时，淀粉最终被水解为麦芽糖和葡萄糖。麦芽糖是两个葡萄糖单元以$\alpha(1\rightarrow4)$糖苷键连接而成的二糖，可被麦芽糖酶切断产生两个葡萄糖分子。于是，淀粉消化最终生成葡萄糖。

例 11.4

能被人类吸收的其他二糖有蔗糖（甘蔗糖）和乳糖（牛奶糖）。蔗糖可被蔗糖酶分解成葡萄糖和果糖，乳糖可被乳糖酶分解成葡萄糖和半乳糖。所有单糖都可生成糖酵解途径的中间物。葡萄糖被己糖激酶转化为 6 -磷酸葡萄糖（糖酵解途径的第 1 步）；果糖也可以被己糖激酶转化为 6 -磷酸果糖，同样，另一单糖甘露糖，也能被转化为 6 -磷酸甘露糖，随后被磷酸甘露糖异构酶转化为 6 -磷酸果糖（图 11 - 15）。

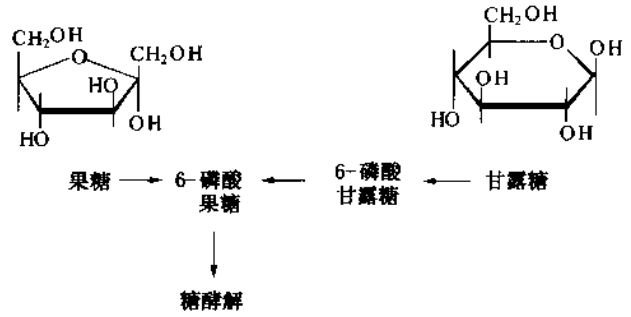


图 11 - 15 果糖与甘露糖转化为糖酵解途径的中间化合物 6 -磷酸果糖

并非所有的单糖都能很轻易地或直接地进入糖酵解途径。例如，半乳糖被半乳糖激酶磷酸化成 1 -磷酸半乳糖，1 -磷酸半乳糖在半乳糖- 1 -磷酸尿苷酰转移酶的作用下与 UTP 反应，产生 UDP -半乳糖。再经 UDP -葡萄糖- 4 -差向异构酶的催化，UDP -半乳糖转化为 UDP -葡萄糖。而后，UDP -葡萄糖与糖原结合，最终以 6 -磷酸葡萄糖的形式再现（图 11 - 16）。

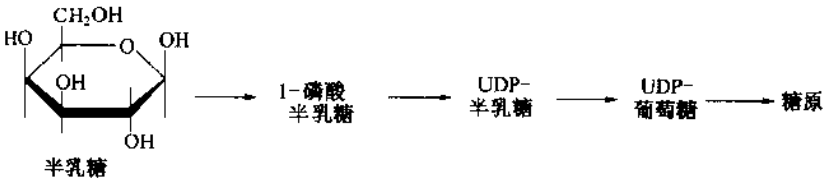


图 11 - 16 半乳糖转化为糖原

一些单糖（如半乳糖）是迂回进入糖酵解途径的，而对另一些单糖，则可以利用替换反应。除了在己糖激酶的作用下被直接转化为 6 -磷酸果糖以外，果糖代谢中的一条替换途径是，在果糖激酶的催化下将果糖转化为 1 -磷酸果糖，随后，在 1 -磷酸果糖羧醛酶的作用下，1 -磷酸果糖分解为磷酸二羟丙酮和甘油醛。甘油醛再被甘油醛激酶磷酸化为 3 -磷酸甘油醛。由此，果糖被转化成为磷酸二羟丙酮与 3 -磷酸甘油醛，糖酵解途径的两个三碳中间体（图 11 - 17）。

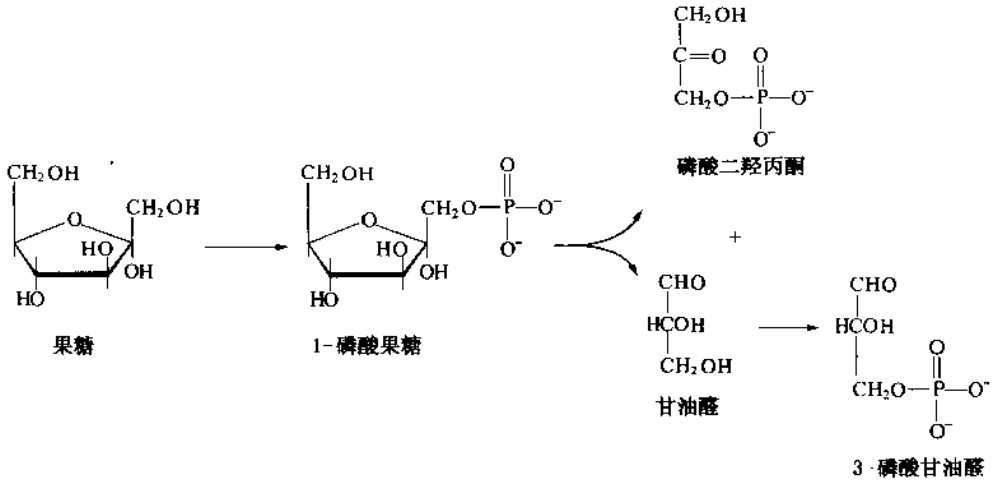


图 11－17　果糖转化为糖酵解途径的中间物磷酸二羟丙酮与 3－磷酸甘油醛

另一个能进入糖酵解途径的三碳化合物是甘油。甘油可被甘油激酶转化为 3－磷酸甘油，继而在 3－磷酸甘油脱氢酶的催化下，3－磷酸甘油转化为磷酸二羟丙酮（图11－18）。

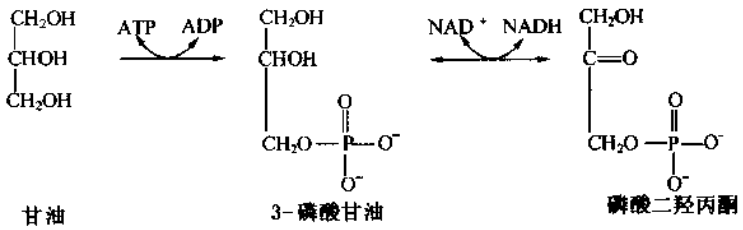


图 11－18　甘油转化为糖酵解途径的中间产物磷酸二羟丙酮

问题：甘油是从何处代谢而来的？

甘油主要是由甘油三酯水解而产生的（见第 13 章）。

所有碳水化合物在降解为丙酮酸时，都会产生同等量的 ATP，即每生成 1mol 丙酮酸释出 1mol ATP，只有一个例外，便是半乳糖。半乳糖转化为 1－磷酸葡萄糖时需要 3 分子 ATP，再转化为1,6－二磷酸果糖时还需要 1 分子 ATP，因而，对半乳糖来说，每生成 1mol 丙酮酸只产生 0.5molATP。

例 11.5

含 D－葡萄糖最丰富的是纤维素。哺乳动物中，纤维素能被转化为糖酵解途径的中间产物吗？

不能。纤维素是 D－葡萄糖以$\beta(1\rightarrow4)$糖苷键的形式结合起来的多糖，哺乳动物细胞由于不含纤维素酶而无法断开此键。

11.7　细胞液中 NAD^+ 的再生成

很多细胞都能从以下三类燃料中获取能量：碳水化合物、氨基酸和脂肪酸。供能最多的便是可在线粒体中被降解为乙酰－CoA 的脂肪酸。从丙酮酸转化而来的乙酰－CoA，能进入柠檬酸循环，并被彻底氧化为 CO_2。此氧化过程可产生能在电子传递系统被氧化的 NADH

与 $FADH_2$。若细胞不含线粒体（如血红细胞）或含的线粒体很少（如骨骼肌细胞），就不可能利用脂肪酸作为燃料或利用能力很弱。故，这些细胞依赖于糖酵解作用来磷酸化 ADP。为了确保能得到足够的、对糖酵解途径的第 6 步极其关键的 NAD^+，这些细胞必然有能将 NADH 再生为 NAD^+ 的机制；如此的机制导致了哺乳动物细胞内的丙酮酸转化为乳酸（乳酸发酵；见 11.2）。

例 11.6

为了糖酵解作用的继续，非哺乳动物细胞利用什么机制再生成 NAD^+？

酵母菌细胞，一种兼性厌氧菌，利用乙醇发酵作用来再生成 NAD^+；丙酮酸脱羧酶催化丙酮酸转化为乙醛，然后，乙醇脱氢酶又将乙醛转化为乙醇，同时将 NADH 氧化为 NAD^+。

问题：若可获得氧，含线粒体的细胞能利用丙酮酸。这些细胞如何处理 NAD^+ 的再生问题？

细胞内含有线粒体意味着这些细胞能够将细胞液中的 NADH 转化为 NAD^+。H 或还原当量则可以通过代谢物的穿梭而被转运至线粒体。

虽然与胞浆相似，线粒体中既有 NAD^+ 也有 NADH，但线粒体膜对细胞液内的化合物来说是不可透膜，因此，线粒体与细胞液之间不能直接交换内容物。而穿梭机制却允许细胞液 NADH 的 H 被转运到其他化合物上进入线粒体，与 NAD^+ 结合（形成线粒体 NADH），或与 FAD 结合（形成线粒体 $FADH_2$）。哺乳动物细胞利用的穿梭机制有多种，其中最重要的两种是苹果酸-天冬氨酸穿梭与 3-磷酸甘油穿梭。

苹果酸-天冬氨酸穿梭

细胞液中的苹果酸脱氢酶可以还原草酰乙酸为苹果酸，从而将 NADH 氧化为 NAD^+（见例 11.1）。苹果酸经线粒体内膜上特殊的蛋白质载体（二羧酸载体）的运载而进入线粒体，并被线粒体苹果酸脱氢酶氧化为草酰乙酸，同时伴有线粒体中 NAD^+ 还原为 NADH 的反应（图 11-19）。这导致细胞液中的 H 进入了线粒体，同时细胞液中的草酰乙酸也必须被置换掉才能使整个过程继续进行。该置换过程由转氨酶催化完成，包括草酰乙酸转化为天冬氨酸和谷氨酸转化为 2-酮戊二酸（见第 12 章）的两个反应。天冬氨酸与 2-酮戊二酸经特殊载体的运载，被转运入细胞液中，再由另一个转氨酶将它们转变回草酰乙酸与谷氨酸。

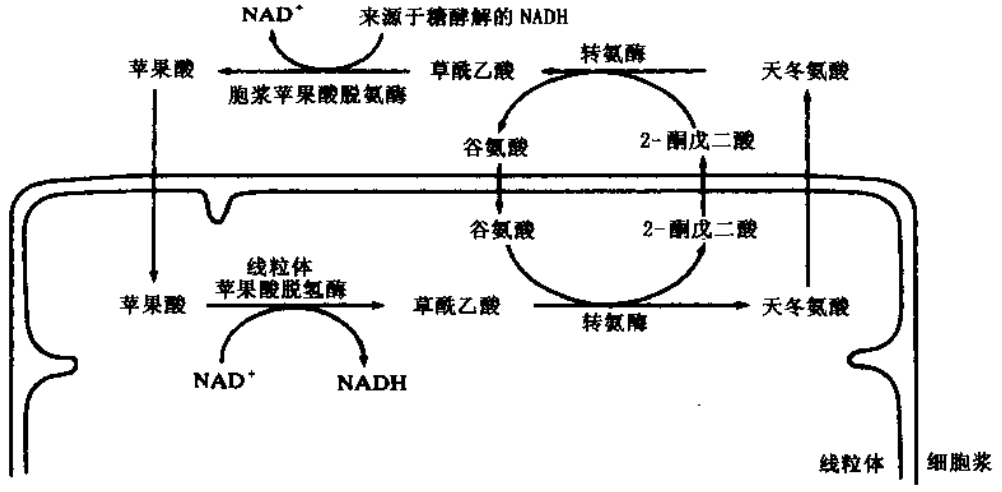


图 11-19 苹果酸-天冬氨酸穿梭，细胞液与线粒体之间还原当量（H）的转运机制

3-磷酸甘油穿梭

细胞液中的3-磷酸甘油脱氢酶可以还原磷酸二羟丙酮为3-磷酸甘油，并伴有NADH氧化为NAD^+的反应。3-磷酸甘油经特异转运蛋白的运载而穿过线粒体外膜，被存在于线粒体内膜中的线粒体3-磷酸甘油脱氢酶再氧化为磷酸二羟丙酮（图11-20）。线粒体3-磷酸甘油脱氢酶催化的氧化还原反应的辅反应剂并非NAD^+，而是FAD（见例11.1，图11-20），被还原为$FADH_2$。磷酸二羟丙酮再扩散回细胞液中，使得循环能继续进行。

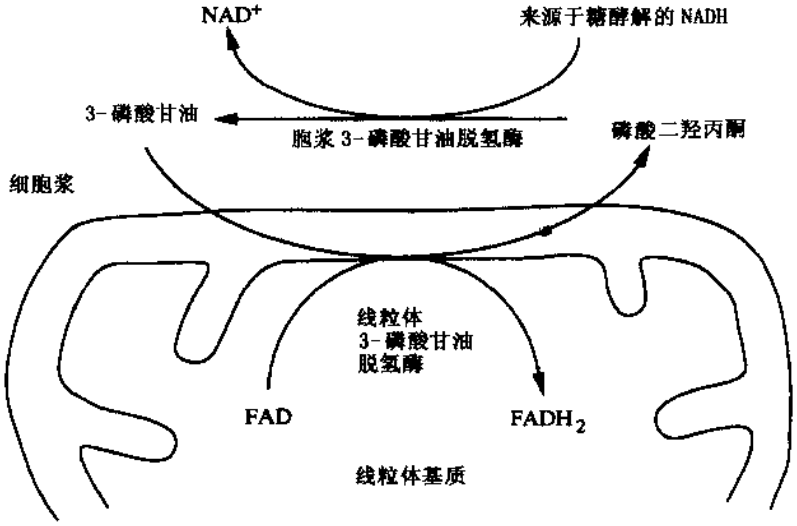


图11-20　3-磷酸甘油穿梭，细胞液与线粒体之间还原当量（H）的转运机制

上述两种机制的结果是细胞液中的NADH被氧化为NAD^+。而H或还原当量则经特异穿梭循环被转运到线粒体中以形成NADH或$FADH_2$。

11.8　糖酵解作用的调控

糖酵解途径中有三个不可逆步骤，催化这三个反应的酶控制着整个代谢途径。关键的调控酶是磷酸果糖激酶（第3步）。它是变构酶，可被ADP和AMP激活，被ATP抑制，因此，细胞处于低能状态时其活性很高，细胞处于高能状态时其活性较低。磷酸果糖激酶的活性还受NADH抑制，这提示如果糖酵解过程中形成的NADH蓄积，那么磷酸果糖激酶将失活，直至NADH被氧化为NAD^+。柠檬酸和长链脂肪酸对磷酸果糖激酶的调节提示，当这些化合物很充足时，不需要葡萄糖降解，所以糖酵解途径的反应被抑制。若磷酸果糖激酶被抑制，则6-磷酸果糖和6-磷酸葡萄糖蓄积，后者通过抑制己糖激酶的活性（第1步）而控制糖酵解作用。这可以被认为是受磷酸果糖激酶影响的糖酵解调控的第二方式。丙酮酸激酶也受高浓度的ATP、柠檬酸与长链脂肪酸的抑制，因而其作用方式与磷酸果糖激酶一致。

另一个调控模式是受3-磷酸甘油醛脱氢酶（第6步）控制的；此酶可被氧化态的辅反应剂（NAD^+）激活，被还原态的辅反应剂（NADH）抑制。如此，若细胞处于高能状态，所有的调控酶共同协作以降低糖酵解速率，保存葡萄糖。

细胞内糖酵解速率会随其能量需求的变化而不断变化。此速率被定义为糖酵解通量。例如，若细胞需要能量，并且只能从葡萄糖获取能量，则糖酵解通量会增大。若葡萄糖或其他产能化合物的降解，已使细胞有了足够的、能满足其近期需求的能量，则糖酵解将受到控制，糖酵解通量会减少。

例 11.7

以葡萄糖为碳源，观察酵母菌在有氧和无氧条件下的生长状况便能很好地说明糖酵解通量是如何快速变化的。这是由巴斯德发现的，被称为巴斯德效应，以图11-21表示。

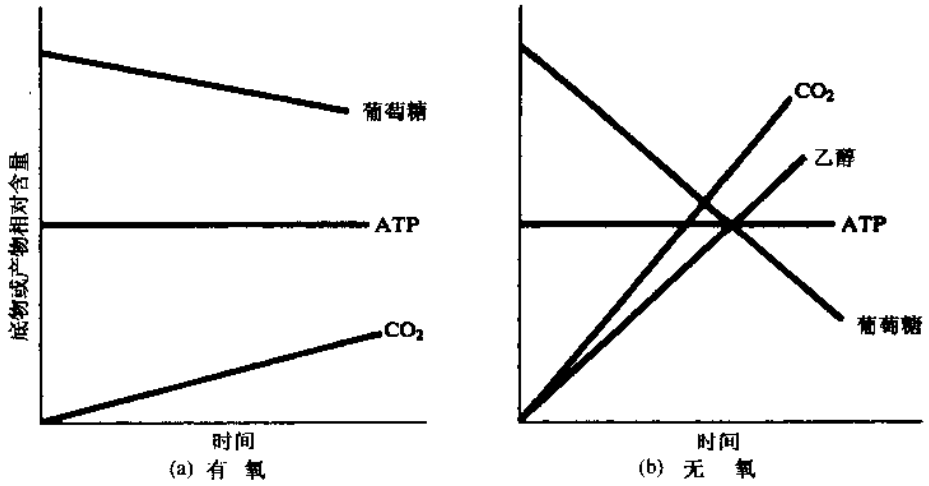


图 11-21 巴斯德效应：在有氧与无氧条件下酵母菌的代谢活性

在有氧条件下生长时，通过糖酵解途径中底物水平的磷酸化作用，酵母菌细胞中 1 分子葡萄糖可产生 2 分子 ATP。所生成的 2 分子丙酮酸能被完全氧化为 CO_2，每一个丙酮酸产生 15 分子 ATP。这导致葡萄糖浓度的缓慢下降，CO_2 的稳定生成，以及 ATP 量的微小变化。同样，两分子 NADH 可经电子传递系统被氧化为 NAD^+（该过程产生更多的 ATP，在第 14 章讨论）。

当酵母菌在无氧环境中生长时，葡萄糖的利用会明显增多，CO_2 和乙醇的生成量会随 ATP 浓度的微量变化而显著上升。此现象有多种解释，最简单的是假设酵母菌需要恒定量的 ATP 作为能量需求，不考虑生长条件。

当酵母菌不能获取氧时，仅能依靠糖酵解途径来产生 ATP。另外，在缺氧条件下，酵母菌细胞无法通过电子传递系统再生成 NAD^+。如果这种状况不能改变，则 ATP 含量会下降，细胞将转向低能状态。这时，糖酵解途径的调控步骤将发挥作用，糖酵解通量增大。于是，启动乙醇发酵作用，以转化丙酮酸成乙醇以及再生成 NAD^+，以便于糖酵解作用的继续。由于每消耗 1 分子葡萄糖只产生 2 分子 ATP，因而糖酵解速率上升；乙醇的生成与葡萄糖的消耗要比有氧条件的快得多。CO_2 的生成也增多，尽管无氧条件下每一分子葡萄糖生成 CO_2 的最大理论产量只是 2 分子，而有氧条件下是 6 分子。故，为了保持 ATP 浓度的恒定，酵母菌在有氧环境中生长所消耗的葡萄糖量要比在无氧条件下的少。同样，在有氧环境中 CO_2 的生成量也比无氧环境中的少。

11.9 糖酵解过程中激素的作用

激素并不直接控制糖酵解速率，但有三个却可间接影响糖酵解速率。这三个激素是：胰岛素、胰高血糖素和肾上腺素。胰岛素主要参与葡萄糖向各类细胞（肝细胞和血红细胞除外）的转运过程，而胰高血糖素和肾上腺素则与肝糖原的降解作用有关，肾上腺素还参与肌糖原的降解过程。

例 11.8

胰岛素和胰高血糖素是在何处产生的？哪些因素可以控制它们被分泌入血液？

胰岛素和胰高血糖素是由胰腺合成与分泌的多肽。胰岛素由 β 胰岛细胞合成，胰高血

糖素由 α 胰岛细胞合成。这两种激素的分泌依赖于血糖浓度：血糖高于 4.5－5.5 mmol/L (80～100 mg/100 ml) 时，分泌胰岛素，若低于 4.5 mmol/L (80 mg/100 ml)则分泌胰高血糖素。

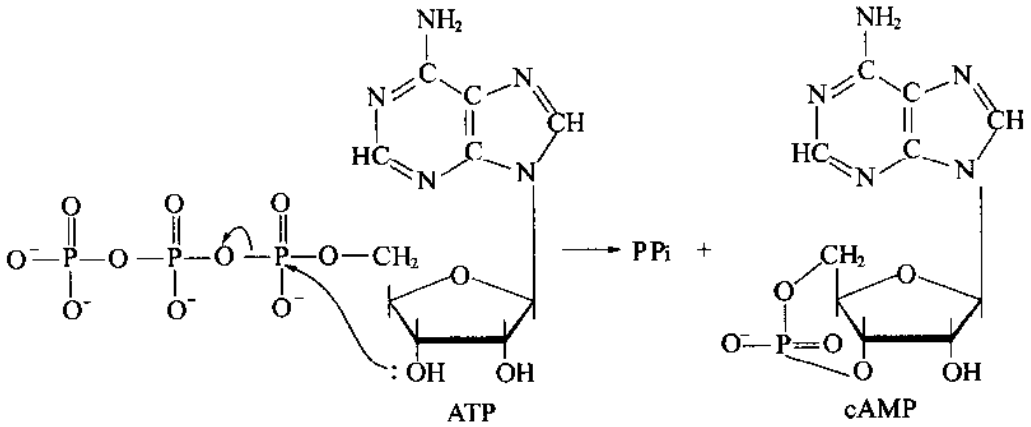
胰岛素与胰高血糖素的作用相反；胰岛素通过几种方式降低血糖含量，这些方式包括①增强葡萄糖吸收入肌肉和脂肪细胞；②激活糖原合成酶；③激活磷酸果糖激酶和葡萄糖激酶。胰岛素作用的总效果是，血糖浓度降低，葡萄糖被转化为糖原，或用于糖酵解途径，或二者间而有之。胰高血糖素的作用则是提高血糖浓度，通过刺激肝糖原降解为 1－磷酸葡萄糖，1－磷酸葡萄糖又被磷酸葡萄糖变位酶转化为 6－磷酸葡萄糖，最终被葡萄糖 6－磷酸酶转化为葡萄糖。

肾上腺素是由肾上腺皮质合成的，在应激反应时被迅速释放入血液，为瞬间肌肉活动传递信号。此激素可刺激肝糖原和肌糖原降解为 6－磷酸葡萄糖，以供肌肉糖酵解的需求。

胰高血糖素和肾上腺素在靶组织中对糖原降解的刺激作用是受环 AMP 介导的（见第 6 章）。

例 11.9

环 AMP，简写成 cAMP，是由腺苷酸环化酶催化的 ATP 分子内环化反应而生成的。



由于激素是由很多氨基酸（胰高血糖素）或单一氨基酸（肾上腺素）衍生而来，因而不能直接进入它们的靶细胞。因此，肝细胞外膜上有识别胰高血糖素和肾上腺素的受体，而肌细胞只有肾上腺素受体。受体结合激素后即发生构象变化，随后变化被传递至膜的内表面，导致腺苷酸环化酶的激活。此酶受受体调节，当受体上未结合激素时该酶无活性，受体上结合有激素时该酶被激活。一旦被激活，腺苷酸环化酶便催化 ATP 环化成 cAMP（图 11－22）。

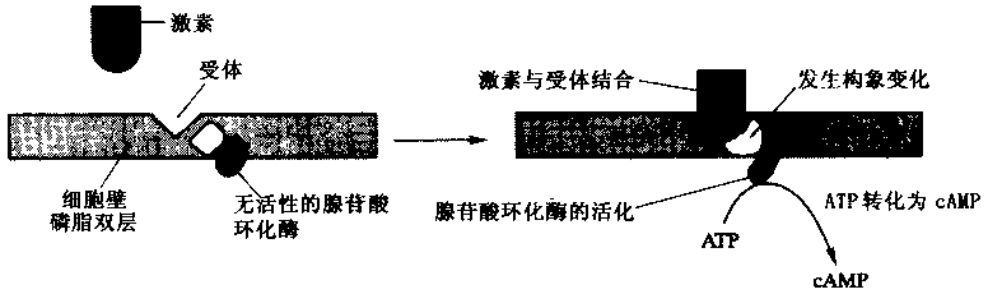


图 11－22　胰高血糖素与肾上腺素激活腺苷酸环化酶的过程

cAMP 被称为第二信使。当特异性激素（第一信使）与其受体相结合时，肝细胞或肌细胞内则产生 cAMP。cAMP 的作用是激活蛋白激酶，它先结合到酶的调节亚基上，而后再从酶上移去该调节亚基（图 11－23）。

活化的蛋白激酶利用 ATP 使，磷酸化酶激酶磷酸化，从而激活它（图11－24）。

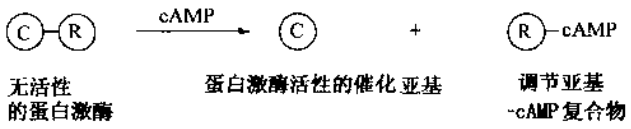


图 11－23 cAMP 激活蛋白激酶的过程

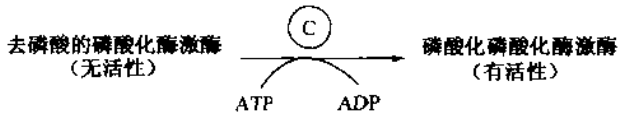


图 11－24 蛋白激酶激活磷酸化酶激酶的过程

最终，活化的磷酸化酶激酶将无活性的磷酸化酶 b 转化为有活性的磷酸化酶 a（图 11－25）。

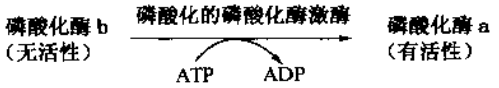


图 11－25 由磷酸化酶激酶催化的磷酸化酶 b 向磷酸化酶 a 的转化

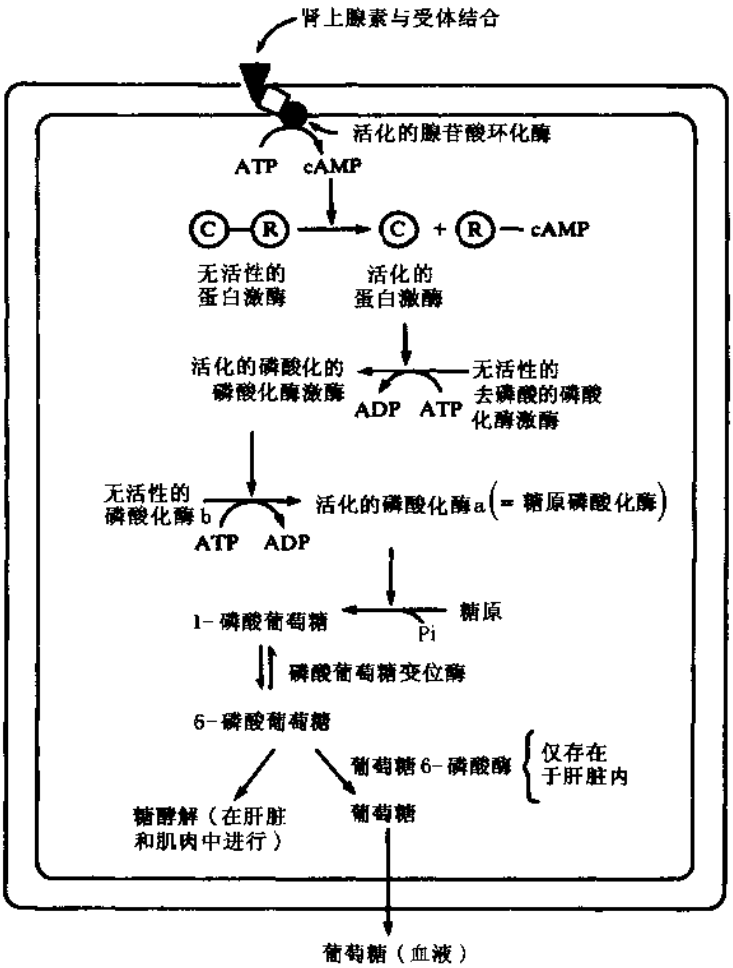


图 11－26 肝细胞或肌细胞内糖原降解过程中肾上腺素的作用

磷酸化酶 a 是糖原磷酸酶的活化形式，可以催化糖原转化为 1 -磷酸葡萄糖。图11 - 26描绘出了肾上腺素作用于肝细胞或肌细胞的整个过程。

问题：上图中联级多步骤的目的是什么？受何因素阻断？

上图中的每一步都需要酶的激活，每一种酶都能协助下一步反应的完成。这便显示了联级效应，每一步都放大了前一反应。有很多方法都能使联级反应速度减缓或停止。如，肾上腺素脱离开受体，使腺苷酸环化酶失活或转变成无活性构型；cAMP 可被磷酸二酯酶催化水解为 AMP；ATP 浓度的增加（源于糖原降解和糖酵解过程中由底物水平磷酸化作用而产生 ATP），将变构抑制磷酸化酶 b 转化为磷酸化酶 a。

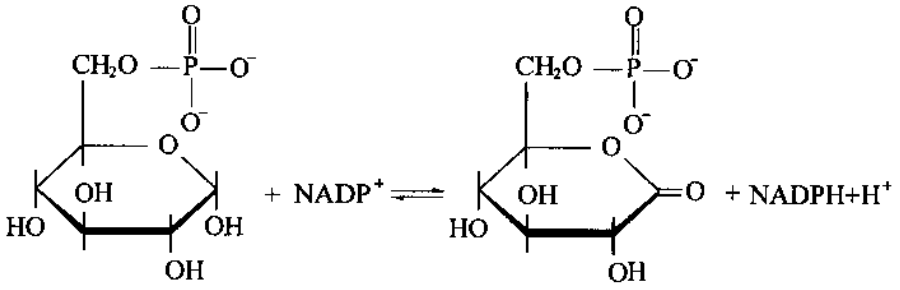
在正常条件下，糖原磷酸酶（磷酸化酶 a）的活性是受胞内 6 -磷酸葡萄糖、ATP、AMP 的调节的；前两个调节剂阻断其活化，后一调节剂促进其活化。

胰高血糖素在肝糖原代谢方面的作用机制与肾上腺素的相似，主要功能是提高血糖至正常水平，而胰岛素则相反。肾上腺素还有一个直接作用，可使肌糖原和肝糖原迅速降解，以便肌肉能获得丰富的 6 -磷酸葡萄糖供给糖酵解作用，因糖酵解作用与血液中充足的葡萄糖来源相关的，而肝脏快速转化糖原为葡萄糖的结果便是血液中葡萄糖的可得性增加。

11.10　磷酸戊糖途径

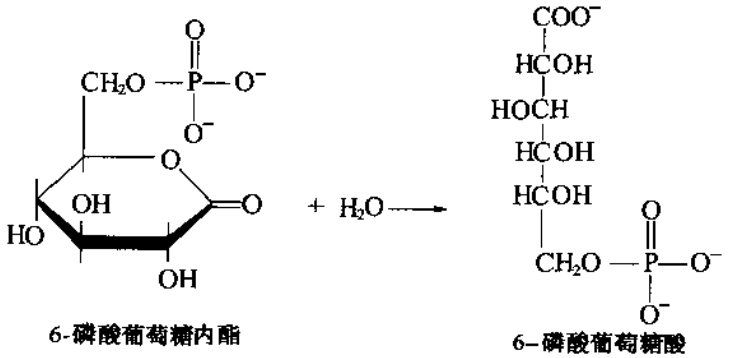
许多哺乳动物细胞能将 6 -磷酸葡萄糖代谢为 C_3、C_4、C_5、C_6 和 C_7 糖。此过程还产生还原型的辅酶 NADPH，NADPH 在脂肪酸和类固醇的生物合成过程被氧化（见第 13 章）。此代谢途径对一些细胞脂肪酸和类固醇的生成过程是非常重要的，如肝脏、哺乳期乳腺、肾上腺皮质、脂肪组织。不需要氧的参与，并在细胞液中进行的磷酸戊糖途径还有另外两个名称：磷酸葡萄糖途径（由该途径的第一个产物而得名）和磷酸己糖支路（因终产物能再进入糖酵解途径而得名）。

第 1 步是在葡萄糖-6 -磷酸脱氢酶的催化下，6 -磷酸葡萄糖 C - 1 上的羟基被氧化，生成环酯（亦称内酯）：



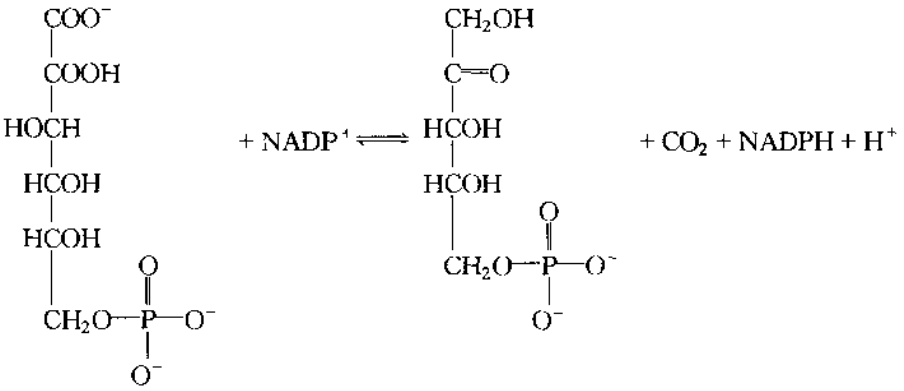
6-磷酸葡萄糖　　6-磷酸葡萄糖内酯

6 -磷酸葡萄糖内酯不稳定，虽能自发水解，但也需要内酯酶的催化（第 2 步）：



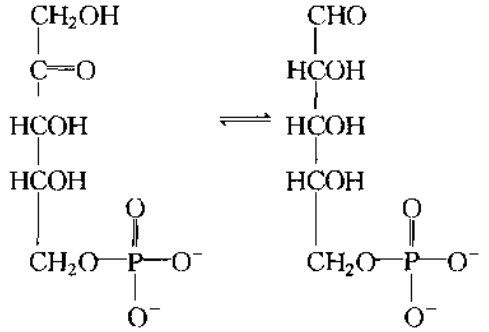
6-磷酸葡萄糖内酯　　6-磷酸葡萄糖酸

第 3 步生成了一个五碳糖，5 -磷酸- D -核酮糖，并伴有 $NADP^+$ 的还原。此步是由 6 -磷酸葡萄糖酸脱氢酶催化的：



6 -磷酸葡萄糖酸　　5 -磷酸- D -核酮糖

而后，5 -磷酸- D -核酮糖在 5 -磷酸核糖异构酶的作用下异构化，成为 5 -磷酸核糖（第 4 步）：



5 -磷酸- D -核酮糖　　5 -磷酸 D -核糖

以上四步组成磷酸戊糖途径的第一阶段，消耗了 1 分子 6 -磷酸葡萄糖，形成了 1 分子

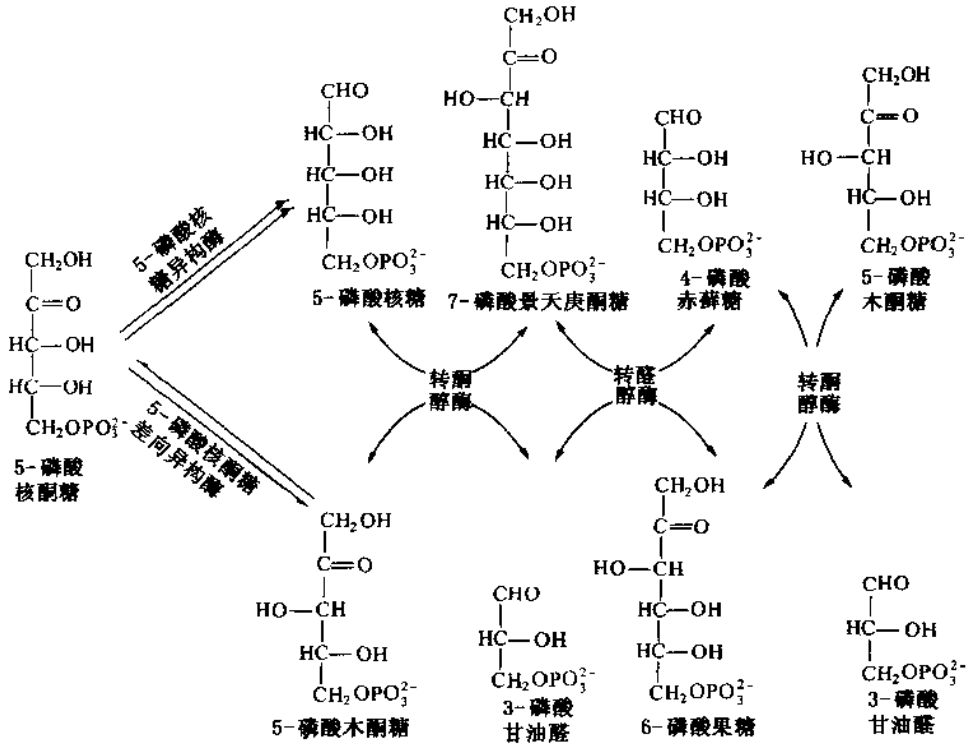


图 11 - 27　磷酸戊糖途径的第二阶段

5-磷酸核糖、2分子NADPH及1分子CO_2。

由于对NADPH的需求远远超出5-磷酸核糖（5-磷酸核糖对核酸与核苷酸的生成是必需的），因此，磷酸戊糖途径的第二阶段利用一系列的可逆反应将五碳糖转化为糖酵解途径的中间产物6-磷酸果糖与3-磷酸甘油醛。此相互转化过程如图11-27所示。磷酸戊糖途径的第二阶段不仅保全了五碳糖的所有碳原子，而且还产生了可用于其他代谢途径的4-磷酸赤藓糖（C_4）、5-磷酸木酮糖（C_5）和7-磷酸景天庚酮糖（C_7）。

例11.10

磷酸戊糖途径的总反应式是什么？

反应平衡式为：

3,6-磷酸葡萄糖 + 6$NADP^+$ ⟶ 3CO_2 + 6NADPH + 2,6-磷酸果糖 + 3-磷酸甘油醛

这表示磷酸戊糖途径中有NADPH生成，并且除6-磷酸葡萄糖分子中的1个碳原子以外其余均可返回进入糖酵解途径。总反应式未能体现出磷酸戊糖途径生成与利用多种磷酸糖的调节能力。

问题解答

糖酵解

11.1　某一化合物是3-磷酸甘油醛脱氢酶的抑制剂。若该化合物被加入以D-葡萄糖为惟一的底物肝细胞中，那么，它对糖酵解中间产物的浓度有何影响？

答：

糖酵解途径中从6-磷酸葡萄糖到3-磷酸甘油醛的中间产物将会蓄积，而从1，3-二磷酸甘油酸到丙酮酸的中间产物将会被耗尽。

11.2　如果习题11.1中的底物是L-乳酸，那么，此抑制剂对糖酵解途径中间产物的浓度又有何影响？

答：

除了丙酮酸浓度可能会升高以外，对糖酵解途径的中间产物没有影响。细胞将乳酸转化为丙酮酸，并以此为柠檬酸循环中乙酰-CoA的前体物。如果细胞不能得到葡萄糖或其他适合的碳水化合物，则糖酵解作用不能进行。

11.3　什么因素阻碍糖酵解途径的中间产物脱离产生它的细胞？

答：

所有的糖酵解途径的中间产物都是磷酸化的。在生理pH下，磷酸基团是被离子化的，因而中间产物都带负电荷。带电荷的分子是不能穿过细胞膜的（除非有特异的运载蛋白），因此，中间产物被限定在细胞液中。

11.4　葡萄糖被转化为丙酮酸的过程中，净氧化变化有多少？

答：

葡萄糖被转化为丙酮酸的过程中，氧化态总体上没有变化，因为3-磷酸甘油醛脱氢酶氧化3-磷酸甘油醛为1,3-二磷酸甘油酸，乳酸脱氢酶还原丙酮酸为乳酸。这两个反应中，NAD^+被还原为NADH，NADH又被氧化成NAD^+。

11.5　如果所有糖酵解途径中的酶，ATP，ADP，NAD^+和葡萄糖一同在理想条件下培养，那么，会产生丙酮酸吗？

答：

不会产生，因为缺少磷酸。即使磷酸被加入培养的混合液中，也只产生与NAD^+量相当的丙酮酸。由于糖酵解途径的第6步，3-磷酸甘油醛脱氢酶催化的反应，需要NAD^+的参与。

丙酮酸的去向

11.6 哺乳动物细胞中，乳酸有何代谢去路？

答：

乳酸仅能参与一个反应，经乳酸脱氢酶氧化为丙酮酸。

Cori 循环

11.7 骨骼肌可以从何处获取碳水化合物用于糖酵解作用？

答：

获取源之一是血糖。葡萄糖进入肌细胞并被迅速转化为 6-磷酸葡萄糖，从而进入糖酵解途径。另一获取源便是可降解为 1-磷酸葡萄糖的肌糖原。1-磷酸葡萄糖再被转化为 6-磷酸葡萄糖，继续推进糖酵解作用。

进入糖酵解的其他碳水化合物

11.8 理论上下列哪个化合物，在糖酵解途径中通过底物水平的磷酸化作用而净生成最多的 ATP？1 分子蔗糖，两分子葡萄糖，或两分子果糖。

答：

这几个化合物都可以产生 4 分子 ATP。蔗糖被转化为 1 分子葡萄糖和 1 分子果糖。每一种糖都需要 2 分子 ATP 以便能达到生成 2 分子 3-磷酸甘油醛的步骤。从这一步到丙酮酸，通过 ADP 的底物水平的磷酸化作用，每一 3-磷酸甘油醛分子都可产生 2 分子 ATP。故，每一分子葡萄糖或果糖能产生 2 分子 ATP。

11.9 蔗糖酶和乳酸酶可以催化哪些反应？

答：

蔗糖酶可以催化蔗糖水解为葡萄糖与果糖。乳糖酶可以催化乳糖水解为葡萄糖与半乳糖。

糖酵解的调控

11.10 如果在糖酵解途径中通过 ADP 的底物水平的磷酸化作用，1 分子葡萄糖产生了 2 分子 ATP 和 2 分子丙酮酸，而每一分子丙酮酸在有氧条件下又可生成 15 分子 ATP，那么，酵母菌在（a）有氧，（b）无氧条件下产生 160 分子 ATP 分别需要多少葡萄糖分子？

答：

(a) 在有氧条件下，每分子葡萄糖产生 $2+30=32$ 分子 ATP。那么，要生成 160 分子 ATP，需要 $160\div32=5$ 分子葡萄糖。

(b) 在无氧条件下，每分子葡萄糖仅产生 2 分子 ATP。那么，要生成 160 分子 ATP，需要 $160\div2=80$ 分子葡萄糖。

11.11 习题 11.10 中，在（a）有氧，（b）无氧条件下产生 160 分子 ATP 的过程中，有多少分子的 CO_2 释出？

答：

(a) 有氧条件：1 葡萄糖 $\longrightarrow 6CO_2$

所以：5 葡萄糖 $\longrightarrow 30CO_2$

(b) 无氧条件：1 葡萄糖 $\longrightarrow 2CO_2$

所以：80 葡萄糖 $\longrightarrow 160CO_2$

补充问题

11.12　在糖酵解途径中，由丙糖磷酸异构酶催化的二羟丙酮磷酸转化为3-磷酸甘油醛的反应是可逆的。已知，反应在平衡时倾向于生成二羟丙酮磷酸，那么，糖酵解作用如何进行？

11.13　血红细胞中，2，3-二磷酸甘油酸可通过将血红蛋白稳定于脱氧形式而降低血红蛋白对氧的亲和性（见第5章）。此效应剂是在某一步由某一糖酵解中间产物合成的，并且在同一步骤中还可被转化为另一糖酵解中间产物。那么，这两个糖酵解途径的中间物是什么？什么样的酶催化这两个反应？

11.14　酵母菌在无氧条件下代谢葡萄糖时，其6个碳原子的去路？

11.15　计算2分子丙酮酸被转化为糖原中的1个葡萄糖单位时所需要的高能磷酸键的数量。

11.16　若肝细胞中抑制己糖激酶活性的6-磷酸葡萄糖浓度较高时，那么，其有何去路？

11.17　白蚁几乎完全靠进食纤维素而生存。白蚁是如何降解纤维素为糖的？哪一种糖可作为能量来源？

11.18　酵母菌于一含有所有营养素的氧饱和的介质中培养，且葡萄糖是惟一的碳源，葡萄糖量随时间而减少，CO_2被释出，ADP和ATP的量几乎保持不变。请解释（a）在缺氧条件下，或（b）在氧与3-磷酸甘油醛脱氢酶的抑制剂同时存在时，酵母菌的代谢过程。

11.19　血液中葡萄糖的浓度是如何维持的，（a）在进食富含碳水化合物饮食后的休息过程中，（b）在持续的运动过程中。

11.20　糖尿病是由于胰腺不能分泌足够有效的胰岛素或产生无效的胰岛素而导致的一种状态。此状态对一健康人的糖代谢过程有何影响？

11.21　一系列的反应中，细胞需要NADPH的量远远超过5-磷酸核糖的量。那么，（a）细胞是如何获得NADPH的，（b）过量的5-磷酸核糖的有何去路？

11.22　肝细胞中以6-磷酸葡萄糖为底物的四个反应是什么？

第12章 柠檬酸循环

12.1 导言

柠檬酸循环是一系列的化学反应，在这一系列反应中含两个碳原子的乙酰-CoA最终被氧化为CO_2。柠檬酸循环是乙酰-CoA释放能量的中心途径，乙酰-CoA由糖（见第12章）、脂肪酸（见第13章）及部分氨基酸（见第15章）代谢而产生；柠檬酸循环还与另外两个过程，电子传递和氧化磷酸化过程（见第14章）密切相关。

问题：什么是乙酰-CoA?

乙酰-CoA是化合物乙酰辅酶A的缩写，其结构式如图12-1所示。辅酶A由三部分组成：带有3′-磷酸基团的ADP，泛酸和β-巯基乙胺。辅酶A是酰基特别是乙酰基的载体，酰基与β-巯基乙胺的硫醇基相连接。因此，辅酶A缩写成CoA，乙酰辅酶A缩写成乙酰-CoA。有些情况下还特别强调硫醇基，将其编入缩写中，即CoASH（辅酶A）和$CoASCOCH_3$或$CH_3COSCoA$（乙酰辅酶A）。

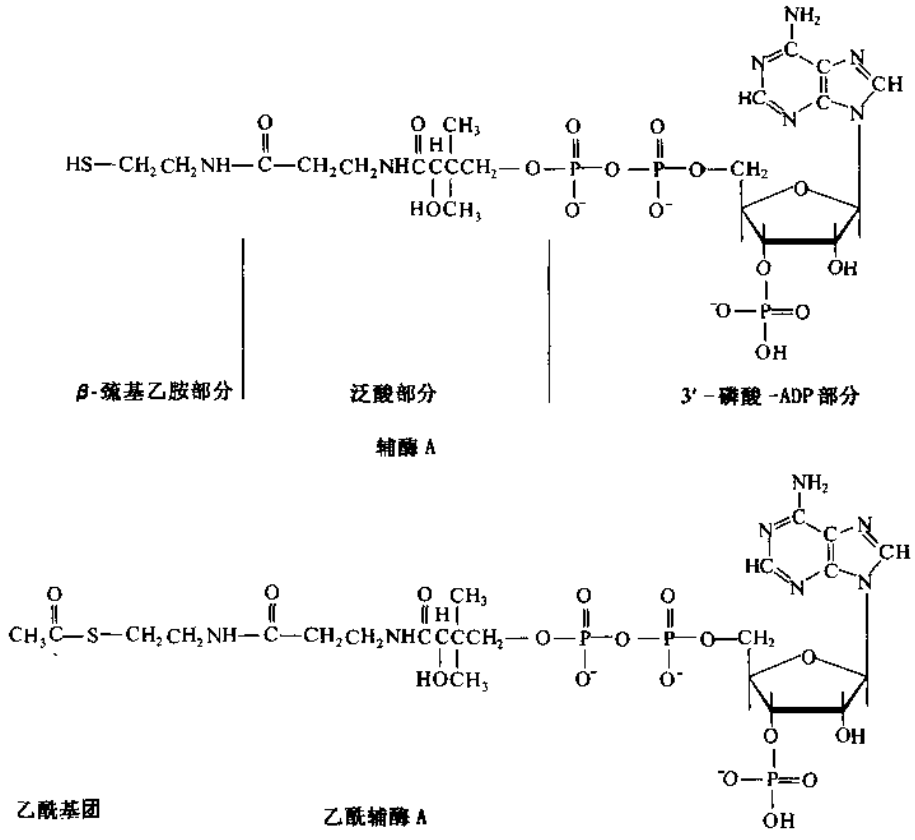


图12-1 辅酶A与乙酰辅酶A的结构图

例 12.1

糖酵解途径中糖（如葡萄糖）的降解可以产生丙酮酸，但糖代谢中乙酰-CoA 是如何生成的？

经过被称为丙酮酸脱氢酶复合体的酶的作用，丙酮酸可以转化为乙酰-CoA（见例 12.3 和第 5 章）。除了一种酶在线粒体内膜上以外，乙酰-CoA 及催化柠檬酸循环各反应的酶都存在于线粒体基质中。

问题：柠檬酸循环为何被如此命名？

该名称是由循环中的第 1 步，草酰乙酸与乙酰-CoA 缩合生成柠檬酸而得来的。并且由于产物是三羧酸，此循环也称三羧酸循环。

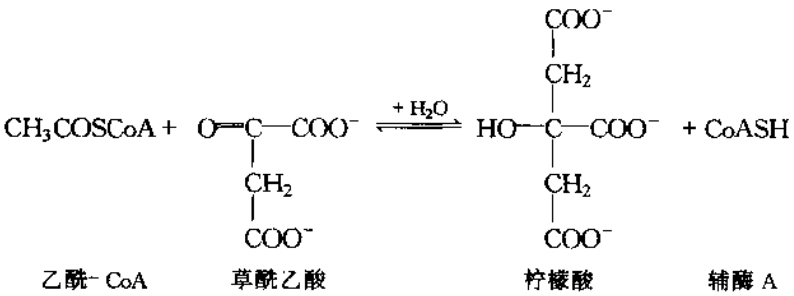
乙酰-CoA 不能穿过线粒体的两层膜，仅能在线粒体基质中形成，主要有三个来源：

1. 糖酵解作用产生丙酮酸，丙酮酸经转运蛋白的运载，轻易穿过线粒体膜而进入基质中，再经丙酮酸脱氢酶的作用被转化为乙酰-CoA。
2. 经特异转运蛋白的运载，脂肪酸（以其 CoA 衍生物）由胞浆进入线粒体基质中，并被氧化为乙酰-CoA。
3. 蛋白质被水解为氨基酸，氨基酸在线粒体基质中被转化为乙酰-CoA（见第 15 章）。

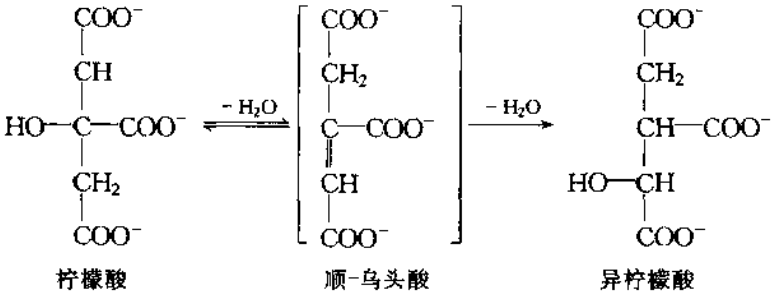
12.2　柠檬酸循环反应

柠檬酸循环中有 8 步反应构成。

第 1 步　在柠檬酸合成酶的作用下，乙酰-CoA 与草酰乙酸缩合成柠檬酸。

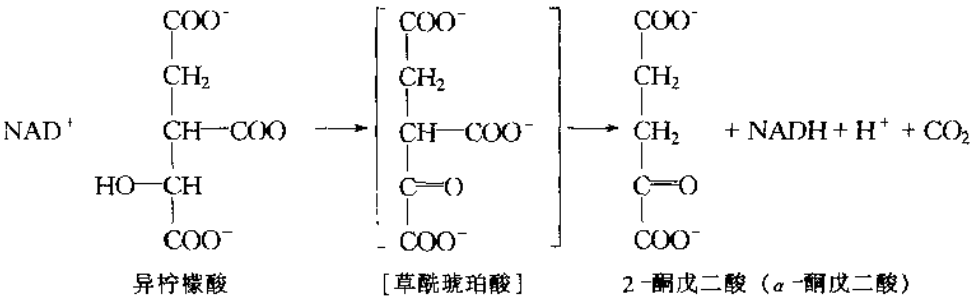


第 2 步　柠檬酸脱水成为顺-乌头酸，随后，顺-乌头酸又水合成为异柠檬酸。这两个可逆反应均由乌头酸酶催化。



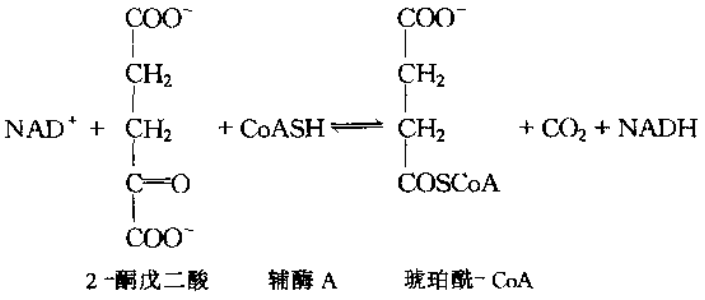
反应中的中间物，顺-乌头酸，与乌头酸酶相连接，并不被作为是柠檬酸循环的独立中间物。

第 3 步　异柠檬酸脱氢酶将异柠檬酸氧化脱羧为 2-酮戊二酸。

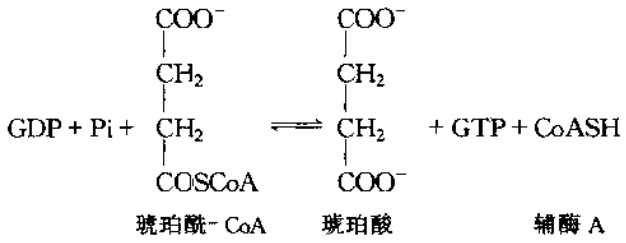


此反应中的中间物草酰琥珀酸，并不与酶脱离，因此不被作为柠檬酸循环的独立中间体。

第 4 步　在 2-酮戊二酸脱氢酶复合体（亦称 α-酮戊二酸脱氢酶）的催化作用下，2-酮戊二酸与辅酶 A（CoASH）生成琥珀酰-CoA。



第 5 步　经琥珀酰-CoA 合成酶的催化，琥珀酰-CoA 转化为琥珀酸。

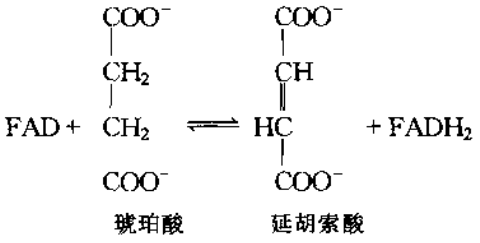


在上述反应中，GDP 的磷酸化是底物水平磷酸化的实例，此反应也是柠檬酸循环中惟一能直接产生高能磷酸键的反应。磷酸化过程所需的能量是由琥珀酰-CoA 硫酯键的水解提供的。而后，经核苷二磷酸激酶的催化，GTP 磷酸化 ADP，

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

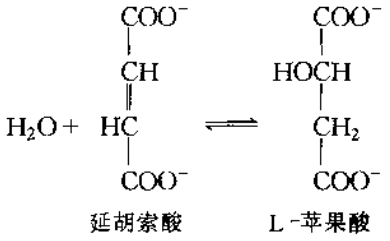
但此反应并不是柠檬酸循环的基本代谢组分。

第 6 步　由琥珀酸脱氢酶的催化，琥珀酸被氧化为延胡索酸。

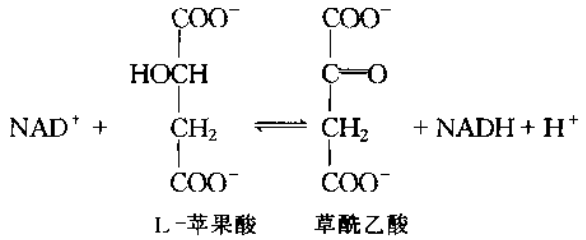


琥珀酸脱氢酶催化了两个 H 的反式消除反应。这是柠檬酸循环中惟一的一个有 FAD 参与的反应，琥珀酸脱氢酶也是循环中仅有的膜被酶。关于这方面的重要性将在第 14 章中讨论。

第 7 步　延胡索酸可逆地水合为苹果酸，此反应由延胡索酸水合酶（也称延胡索酸酶）催化。



第 8 步　苹果酸在苹果酸脱氢酶的作用下生成草酰乙酸。



第 8 步中草酰乙酸的再生成标志着循环反应的完成，草酰乙酸与另一分子乙酰-CoA 缩合可延续下一轮循环。要注意到，柠檬酸循环实际上没有开端，或终结（图 12-2）；如果任意一个中间物在线粒体中产生或能进入线粒体，那么，它们将参与到循环的反应中去，并能永久地被再生成。对于柠檬酸循环来说，乙酰-CoA 是惟一的燃料，不能被再生成，其碳原子在第 3、4 步中以 CO_2 的形式被释出。

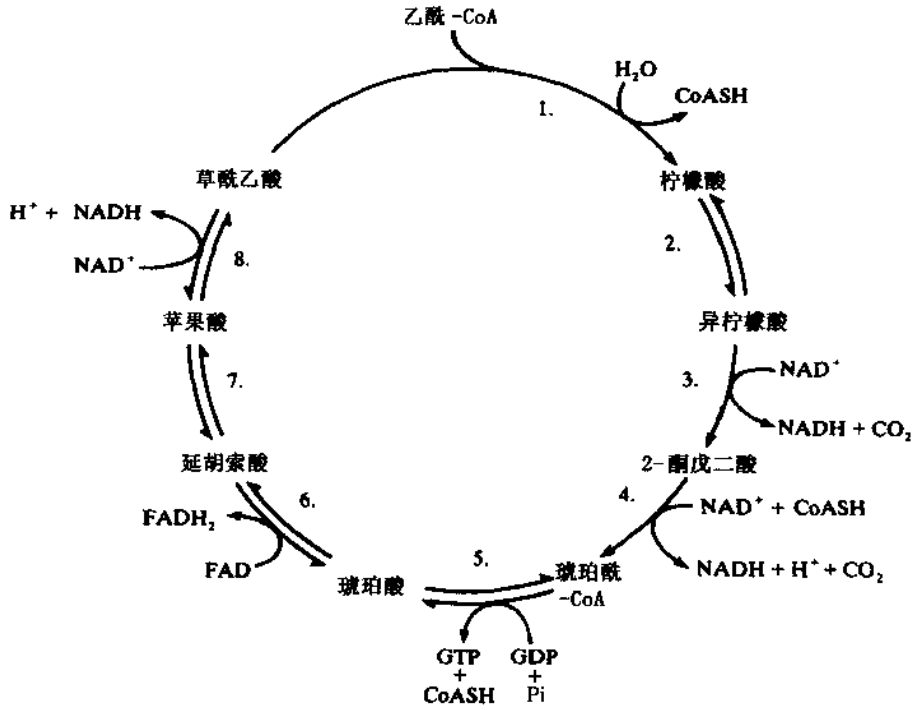


图 12-2　柠檬酸循环，反应编号相应于文中的步骤

问题：柠檬酸循环是呼吸作用的一部分。氧直接参与循环中的反应吗？

不参加。虽然柠檬酸循环中的任一步骤都无氧的参与，但却在两个引起呼吸作用的部分化学计量的步骤中释出了 CO_2。

12.3　柠檬酸循环的能量学

总的来看，柠檬酸循环中 1 分子乙酰-CoA 的消耗是放能过程；$\Delta G^{0'} = -60\ kJ\ mol^{-1}$。除了第 2 步（柠檬酸⟶异柠檬酸）和第 8 步（苹果酸⟶草酰乙酸）是吸能反应以外，其余都是放能反应（图 12-3）。

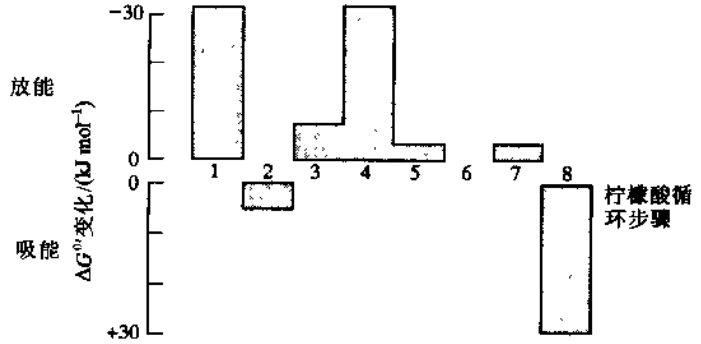


图 12-3　柠檬酸循环中反应的能量学

问题：柠檬酸循环中两个不易发生的反应是如何被克服的？

这两个反应的后续反应都是放能反应。苹果酸⟶草酰乙酸的反应利于苹果酸的生成，所以平衡时草酰乙酸的浓度很低。其后续反应（草酰乙酸 + 乙酰-CoA ⟶柠檬酸）（第 1 步）是放能反应，草酰乙酸被移去与乙酰-CoA 缩合促使前一反应得以进行。与此相似，柠檬酸转化为异柠檬酸的反应也是吸能反应，反应平衡倾向于柠檬酸的生成。而其后续反应（异柠檬酸⟶2-酮戊二酸）是一放能反应，因此异柠檬酸被不断移去，使前一反应能继续进行。

柠檬酸循环中乙酰-CoA 的利用率依赖于线粒体中的能量状态。高键能状况下，NADH 和 ATP 的浓度都较高，NAD^+ 和 AMP 的量都较低。描述能量状况，通常都不用绝对浓度，而是用相对比率，如 NAD^+/NADH 和 AMP/ATP。由此，高能状态预示着低 NAD^+/NADH 比率或高 NADH/NAD^+ 比率，及低 AMP/ATP 比率或高 ATP/AMP 比率。

例 12.2

如果 NADH 和 $FADH_2$ 不能被再氧化，那么对柠檬酸循环的反应有何影响？

一旦所有的 NAD^+ 和 FAD 都被还原为 NADH 和 $FADH_2$，那么循环反应将终止。NADH 和 $FADH_2$ 的再氧化过程是在电子传递系统进行的，比柠檬酸循环运转的潜在速率要慢。由于 NADH 和 $FADH_2$ 的再氧化导致能量的传导，因此循环是受线粒体能量需求调控的。要知道，这些氧化态与还原态辅助因子在细胞液和线粒体中的量都很少，它们必须被快速地相互转化，代谢才能继续进行。

12.4　柠檬酸循环的调节

柠檬酸循环中有四个主要的调节酶，分别是柠檬酸合成酶（第 1 步）、异柠檬酸脱氢酶（第 3 步）、2-酮戊二酸脱氢酶（第 4 步）和琥珀酸脱氢酶（第 6 步）。

第 1 调控步骤，柠檬酸合成酶催化乙酰-CoA 与草酰乙酸缩合成柠檬酸（$\Delta G^{0'} = -32.2\ kJmol^{-1}$）。虽然反应是可逆的，但由于中间物柠檬酰-CoA 中一个键的水解而使得平衡非常倾向于柠檬酸的生成（图 12-4）。柠檬酰-CoA 与柠檬酸合成酶结合在一起，其硫酯键的水

解是一个放热过程，产生柠檬酸和辅酶。柠檬酸合成酶受其底物（乙酰－CoA 和草酰乙酸）的抑制，其活性受线粒体能量状况（低 NAD^+/NADH 比率抑制酶活性）的影响，也受与乙酰－CoA 竞争活性位点的琥珀酰－CoA 的影响。

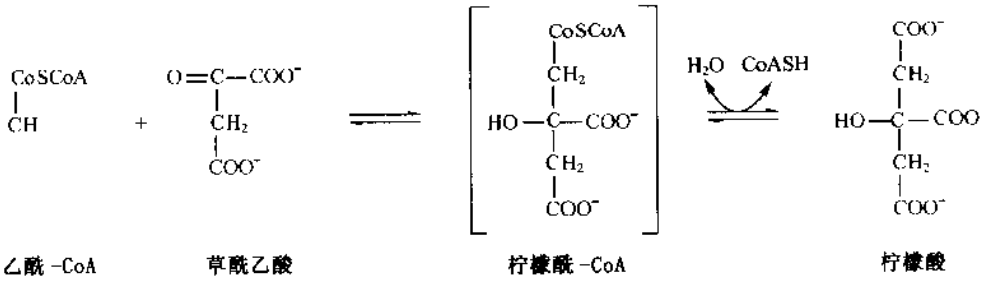


图 12－4　由柠檬酸合成酶产生的柠檬酰－CoA 中间物

柠檬酸循环中的第二个调节步骤是，由异柠檬酸脱氢酶催化的异柠檬酸向 2－酮戊二酸的转化过程。此步骤的脱羧作用使反应不可逆地向 2－酮戊二酸生成的方向进行。异柠檬酸脱氢酶是变构酶（参见第 9 章），可被 ADP 和 NAD^+ 激活，受 ATP 与 NADH 抑制。当带有高能键的化合物（或那些能产生带有高能键化合物的物质）浓度升高是，异柠檬酸脱氢酶受抑制；循环中的其余反应被阻碍，异柠檬酸蓄积。由柠檬酸生成异柠檬酸是可逆反应，若异柠檬酸不能被其他反应所利用，那么，柠檬酸异柠檬酸反应将趋向于平衡。平衡时，这两种化合物的相对量分别为－93%与－7%。因此，异柠檬酸脱氢酶受抑制导致柠檬酸浓度的增大，特异的转运蛋白可以将它运出线粒体，进入细胞液中。这便是作为糖酵解途径的两个酶，磷酸果糖激酶与丙酮酸激酶（图 12－5）的抑制剂的柠檬酸的来源。

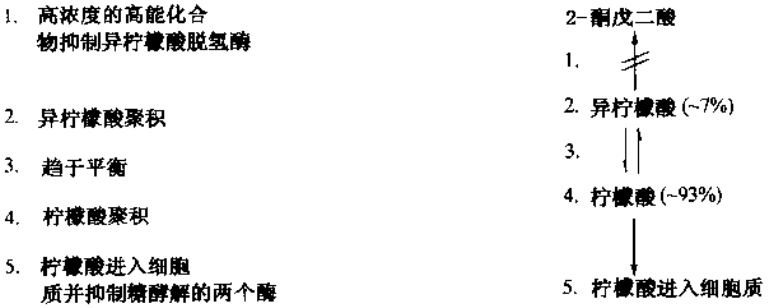


图 12－5　线粒体中高能化合物浓度的提高对糖酵解作用的控制

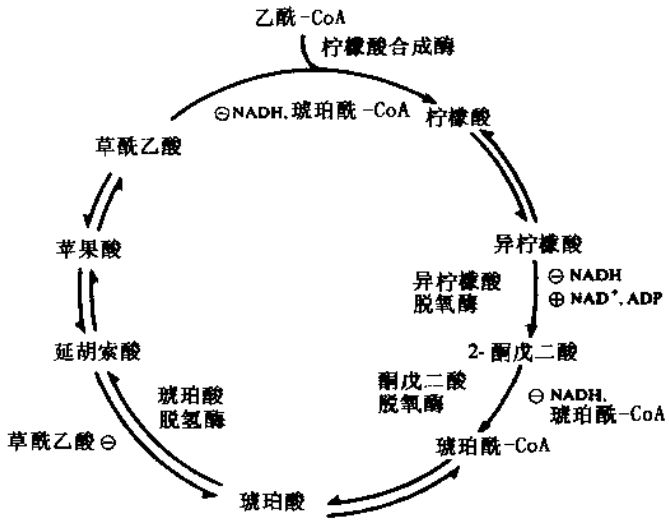


图 12－6　柠檬酸循环中的四个调节步骤。⊕＝活化作用；⊖抑制作用

柠檬酸循环中的第三个控制步骤是由 2－酮戊二酸脱氢酶催化的反应。此多酶复合体受反应产物 NADH 与柠檬酰－CoA 的抑制。同样，高能状态（高 NADH/NAD^+ 比率）将在此步反应中减缓循环速度。

循环中的第四个控制步骤是由琥珀酸脱氢酶催化的琥珀酸转化为延胡索酸的反应。此酶受草酰乙酸抑制，因而，任意引起草酰乙酸蓄积的因素，都将抑制该酶的活性；故，草酰乙酸反馈回来，阻断其合成所必经的反应。这种现象被称为负反馈（见第 9 章）。

图 12－6 给出了柠檬酸循环的主要调节步骤。

12.5　丙酮酸脱氢酶复合体

乙酰－CoA 是由脂肪酸、蛋白质以及糖产生的，是中间代谢的中心及主要化合物。由脂肪酸与蛋白质降解生成乙酰－CoA 的机制将分别在第 13 章和第 15 章讨论；这里要论述的是碳水化合物生成这一重要分子的方法。所有可降解的糖都可经糖酵解途径产生丙酮酸，丙酮酸再被转化为乙酰－CoA。丙酮酸能够进入线粒体基质中，是多酶复合体丙酮酸脱氢酶的底物。

问题：丙酮酸脱氢酶复合体催化的总反应是什么？

$$\underset{\text{丙酮酸}}{CH_3COCOO^-} + NAD^+ + CoASH \longrightarrow \underset{\text{乙酰－CoA}}{CH_3COSCoA} + CO_2 + NADH$$

复合体由三个酶组成：丙酮酸脱羧酶（E_1），二氢硫辛酸乙酰转移酶（E_2）和二氢硫辛酸脱氢酶（E_3）。第一步反应是丙酮酸脱羧产生 2－羟乙基残基，2－羟乙基残基通过其辅基硫胺素焦磷酸（TPP）的作用与丙酮酸脱氢酶结合。复合体的第二个酶（二氢硫辛酸乙酰转移酶）催化第二步反应，正如其名称一样，先将乙酰基（由 2－羟乙基残基氧化产生）转移到酶的硫辛酸臂上，然后再转移给 CoA 形成乙酰－CoA。在此步反应中，硫辛酸被转化为完全还原态，随后去还原二氢硫辛酸脱氢酶的 FAD 辅基为 $FADH_2$。最终，被还原了的辅基，$FADH_2$，通过将 NAD^+ 转化为 NADH 而被再氧化成 FAD。由于组织中 CO_2 浓度相对较低而

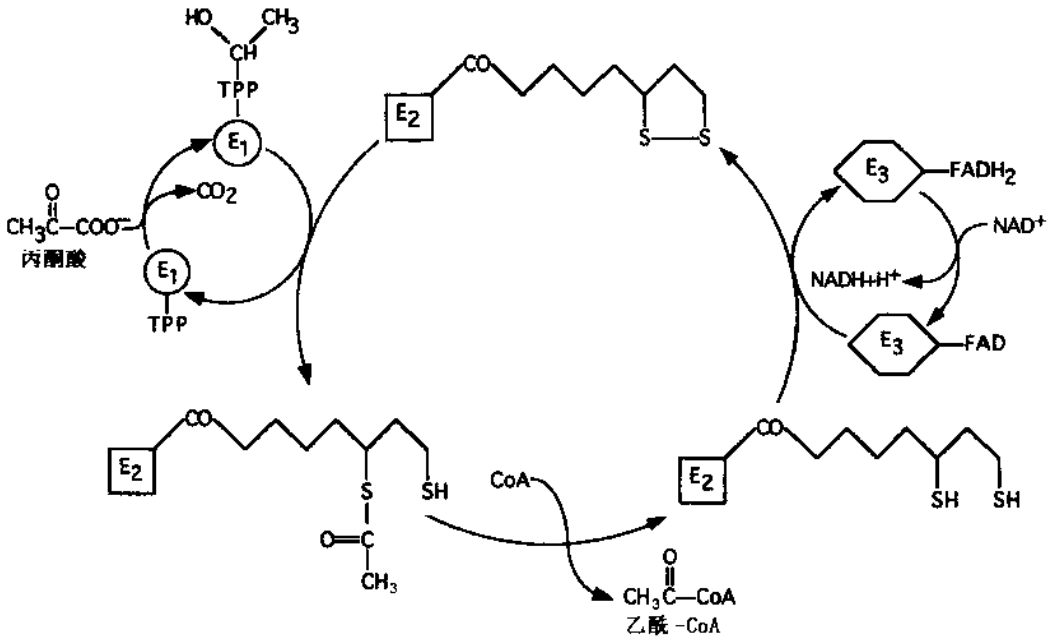


图 12－7　丙酮酸脱氢酶复合体的反应。整个反应中的各反应物已表示在框内

E_1＝丙酮酸脱羧酶（以硫胺素焦磷酸 TPP 为辅基）；E_2＝二氢硫辛酸转移酶（以氧化的硫辛酸为辅基）；E_3＝二氢硫辛酸脱氢酶（以 FAD 为辅基）

引起的不可逆脱羧步骤，使总反应系列不可逆。但其他的反应都是可逆的。复合体的各种反应如图 12－7 所示。

因柠檬酸循环的主要功能是氧化乙酰－CoA，随之产生 ATP，所以，循环反应运转的速率取决于乙酰－CoA 的可获得性。因此，细胞的能量状态可控制丙酮酸脱氢酶复合体的活性。若乙酰－CoA 或 ATP 的量较低，则复合体被激活产生乙酰－CoA。若由于脂肪酸或蛋白质的分解使乙酰－CoA 的量较多时，或线粒体处于较高能量状态时，复合体被抑制。后述的抑制将减低丙酮酸降解速率，随之葡萄糖降解速率也降低。

例 12.3

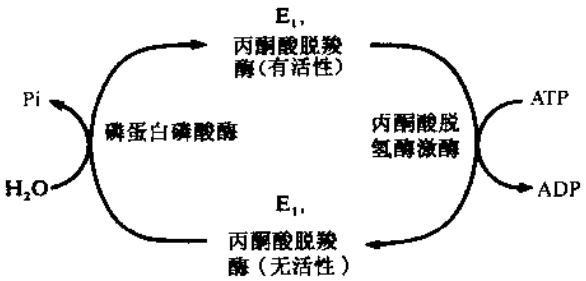


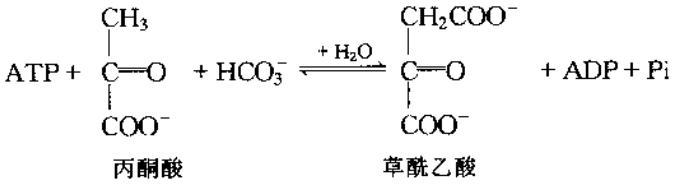
图 12－8　丙酮酸脱氢酶复合体中丙酮酸脱羧酶的磷酸化/去磷酸化对复合体活性的调控

丙酮酸脱氢酶复合体活性的控制是由可使该酶失活的丙酮酸脱羧酶（E_1）的磷酸化作用来实行的。这一过程由与 E_1 紧密结合的丙酮酸脱氢酶激酶所催化。丙酮酸脱氢酶激酶在高能条件下被激活，并且磷酸化步骤的完成也需要 ATP 的参与。另一个酶，磷蛋白磷酸酶，与 E_1 有弱连接，可以移去起抑制作用的磷酸基团而再激活此系统（图12－8）。

丙酮酸脱氢酶复合体并非是构成柠檬酸循环的反应的直接部分。但却将糖酵解与柠檬酸循环连接起来，其活性受线粒体能量状况所调控。

12.6　丙酮酸羧化酶

丙酮酸羧化酶是另一个非柠檬酸循环组分的酶，但实际上其作用却与柠檬酸循环密切相关。此酶的功能已在第 11 章中论述过，考虑它和丙酮酸脱氢酶与柠檬酸循环的关系是非常重要的。



上述反应的产物，草酰乙酸，既可以转化为苹果酸而进入糖异生途径（见第 11 章），也可以与乙酰－CoA 缩合生成柠檬酸。丙酮酸羧化酶是变构酶，被其异促效应剂乙酰－CoA 所激活。因此，线粒体中的丙酮酸既是丙酮酸脱氢酶的底物，也是丙酮酸羧化酶的底物，反过来，这两种酶活性受与柠檬酸循环相关的反应物的调节。丙酮酸脱氢酶，丙酮酸羧化酶，丙酮酸与柠檬酸循环之间的相互作用如图 12－9 所示。

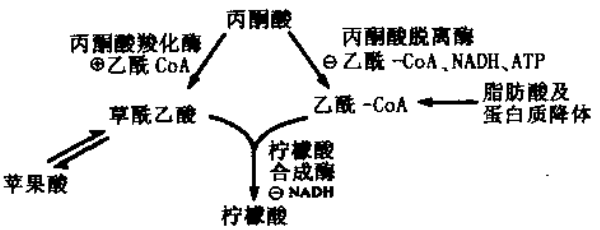


图 12－9　线粒体中丙酮酸的去路。
⊕＝活化作用；○＝抑制作用

例 12.4

线粒体中丙酮酸的去路取决于线粒体的能量状态。如果高能化合物水平提高，即 ATP 与 NADH 量很丰富，则丙酮酸脱氢酶会受抑制。若乙酰－CoA 水平较高（可能由脂肪酸或蛋白质降解而来），也会抑制丙酮酸脱氢酶，丙酮酸将因其被转化为乙酰－CoA 的过程受阻断

而被贮存。但在这样的条件下，乙酰-CoA 会激活丙酮酸羧化酶，由此产生草酰乙酸。草酰乙酸的缺阻碍乙酰-CoA 转化为柠檬酸，导致乙酰-CoA 大增。活化丙酮酸羧化酶的机制允许由丙酮酸生成草酰乙酸。(缺乏草酰乙酸的另一个原因将在例 12.6 中讨论)

12.7　柠檬酸循环的两性特点

除了能生成电子传递过程中的两个高能燃料 NADH 与 $FADH_2$ 以外，柠檬酸循环还有另外两个功能。循环的一些中间化合物可被用于合成其他的细胞组分。为其他代谢或生物合成途径提供化合物是循环的同化作用（表 12.1）。而细胞内发生的一些其他过程也会产生柠檬酸循环的中间物。这些化合物进入循环中，它们的降解便是柠檬酸循环的异化作用。这两个重要的功能将柠檬酸循环划归为两性循环（希腊语中 amphi 意为“双方面”）。

表 12.1　柠檬酸循环中的异化与同化反应

异化反应	
中间物的清除	代谢去路
柠檬酸	脂肪酸生物合成
2-酮戊二酸	谷氨酸的合成
琥珀酰-CoA	血红素的生物合成
苹果酸	糖异生作用
草酰乙酸	天冬氨酸的合成
同化反应	
产生的中间产物	来　源
2-酮戊二酸	谷氨酸
琥珀酰-CoA	
草酰乙酸	部分氨基酸的降解（见第 15 章）
延胡索酸	
2-酮戊二酸	
草酰乙酸	天冬氨酸

例 12.5

如果柠檬酸循环的中间产物通过细胞内的其他反应进入循环，它们会被氧化吗？

例如，1 分子 2-酮戊二酸进入循环中，经过一周的循环，其代谢为：

$$2\text{-酮戊二酸}^{2-} + 3NAD^+ + FAD + GDP^{3-} + P_i^{2-} + 2H_2O + \text{乙酰-CoA} \longrightarrow$$

$$2\text{-酮戊二酸}^{2-} + 2CO_2 + 3NADH + FADH_2 + 2H^+ + GTP^{4-} + CoA$$

仅有乙酰-CoA 的乙酰基被氧化为 CO_2；2-酮戊二酸被再生成。

例 12.6

如果柠檬酸循环的中间物脱离循环，进入其他异化途径，为什么循环还能继续进行？

循环可氧化乙酰-CoA，并为了循环能够继续，必须将乙酰-CoA 转化为柠檬酸。要完成这一过程，必须要获得草酰乙酸。如若中间物的脱离导致了草酰乙酸的减少，则乙酰-CoA 不能被转化，将蓄积。这将使丙酮酸脱氢酶复合体受到抑制，而激活丙酮酸羧化酶，引起丙酮酸向草酰乙酸的转化。生成的草酰乙酸可与乙酰-CoA 缩合产生柠檬酸，以便修复原状。丙酮酸羧化酶催化的为柠檬酸循环补充中间物的反应，被称为回补反应（希腊语意为“填补”：ana＝“up”＋plerotikos 来源于 pleroum＝“to make full”）。

12.8　乙醛酸循环

有些能利用乙酸作为惟一碳源的植物与细菌可经柠檬酸循环氧化乙酰-CoA，或是经过

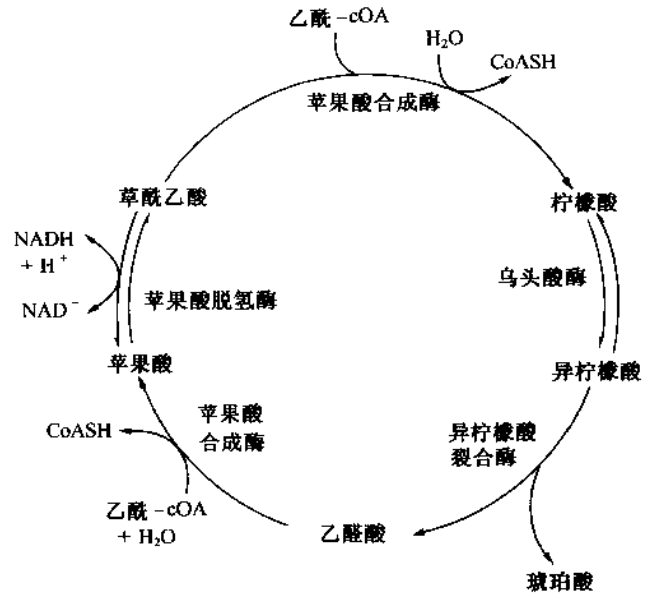
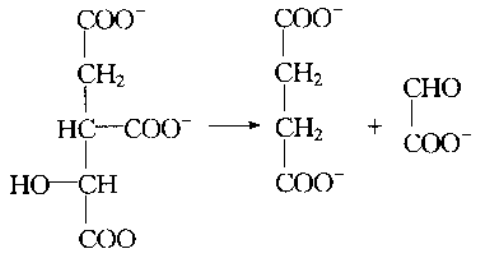
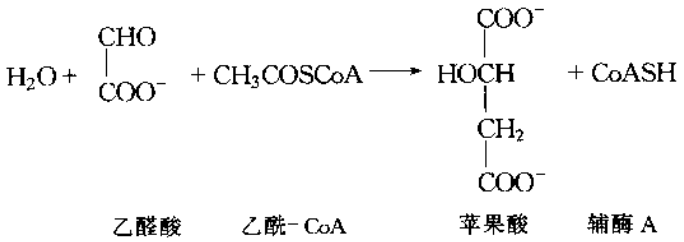


图 12－10　乙醛酸循环

柠檬酸循环的修饰途径将乙酸转化为碳水化合物。这一途径被称为乙醛酸循环（图12－10），植物中该循环发生在被称为乙醛酸循环体的细胞器内。循环所需要的酶在发芽的植物种子中活性很高，以便在其生长过程中能将储存的脂肪酸转化为碳水化合物。动物不含有乙醛酸循环的酶，因而不能将脂肪酸转化为碳水化合物。乙醛酸循环途径的两个特异性反应是由异柠檬酸裂合酶与苹果酸合成酶催化的。





上述反应生成了两个重要的中间化合物，琥珀酸与苹果酸（可被转化为草酰乙酸）。柠檬酸循环中的两个脱羧步骤被饶过而行，因此，不存在乙酰－CoA 被氧化为 CO_2 的过程。虽然利用了两分子的乙酰－CoA，但所有的碳原子都被保留了下来。

问题：乙醛酸循环的总反应是什么？

$$2\ 乙酰\text{-}CoA + 2H_2O + NAD^+ \longrightarrow 琥珀酸^{2-} + NADH + 3H^+ + 2CoASH$$

问题解答

柠檬酸循环反应

12.1　一轮完整的柠檬酸循环过程中，总体上有哪些化学变化？

答：

总体化学反应为，1 分子乙酰-CoA 被完全氧化产生 2 分子 CO_2，3 分子 NAD^+ 及 1 分子 FAD 被还原，1 分子 GDP 被磷酸化。

12.2　柠檬酸循环的总反应式是

$$CH_3COSCoA + 2H_2O + 3NAD^+ + FAD + GDP + Pi \longrightarrow$$
$$2CO_2 + 3NADH + 3H^+ + FADH_2 + GTP$$

每消耗 1 分子乙酰-CoA 只产生 1 个 ATP 当量（GTP）吗？

答：

只直接产生了 1 个 ATP 当量，但在电子传递和氧化磷酸化（见第 14 章）过程中，NADH 与 $FADH_2$ 的还原还产生了另外 11 分子 ATP。

12.3　柠檬酸循环中有多少步骤包含（a）氧化-还原作用，（b）水合-去水合作用，（c）底物水平的磷酸化作用，（d）脱羧作用？并列出相应于这些反应的酶。

答：

（a）有四个步骤包含氧化-还原作用。相应的酶是异柠檬酸脱氢酶，2-酮戊二酸脱氢

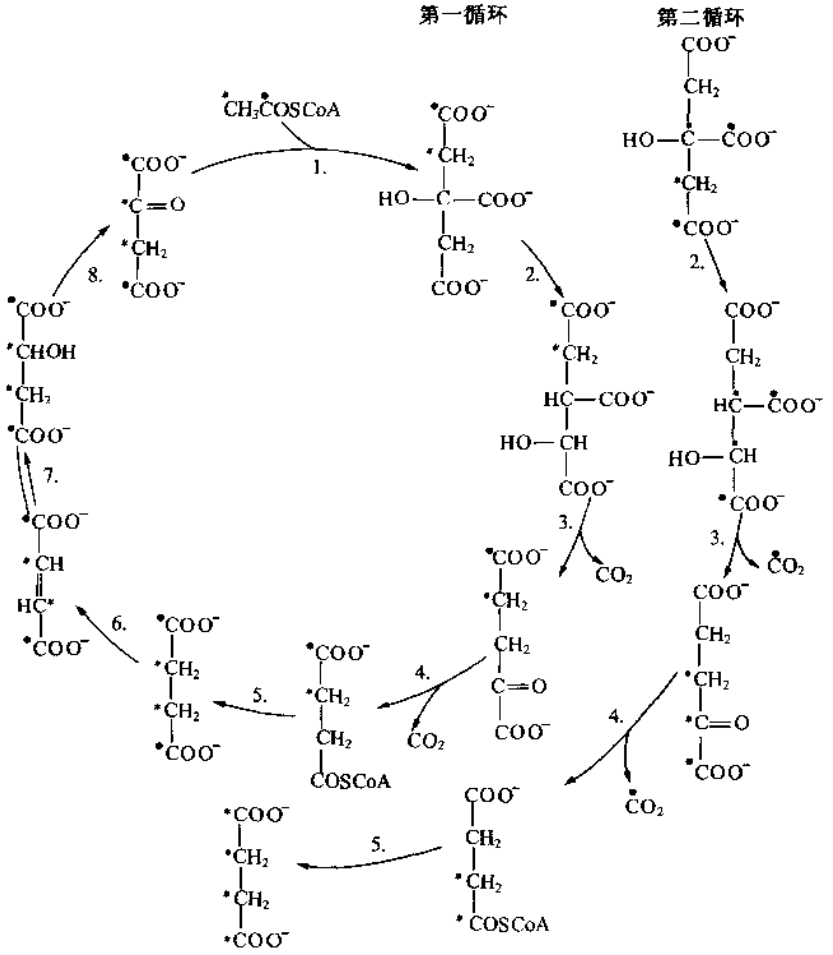


图 12-11　柠檬酸循环中乙酰-CoA 碳原子的分配

酶，琥珀酸脱氢酶，与苹果酸脱氢酶。

(b) 有两个步骤包含水合-去水合反应。相应的酶是顺乌头酸酶和延胡索酸酶。

(c) 只有一个步骤是底物水平的磷酸化反应，催化该反应的酶是琥珀酰-CoA合成酶。

(d) 有两个步骤包括脱羧作用。催化反应的酶为异柠檬酸脱氢酶和2-酮戊二酸脱氢酶。

12.4 每一次，1分子乙酰-CoA被氧化，即产生2分子CO_2。那么，乙酰-CoA的碳原子在其第一轮循环中会被转变为CO_2吗？

答：

不会。图12-11给出了两轮循环中1分子乙酰-CoA中碳原子的去路。两个碳原子可被示踪，直到第5步，它们被随机形成了对称的琥珀酸分子，这表明对称琥珀酸分子中的两个亚甲基来源于乙酰-CoA中甲基的可能性相当。第二轮的第3、4步每一步都生成CO_2，其50%源于乙酰-CoA的羧基碳。在第三轮循环中，这两步综合起来以CO_2的形式释出了其余50%被标记的甲基碳原子，向前进入下一循环。

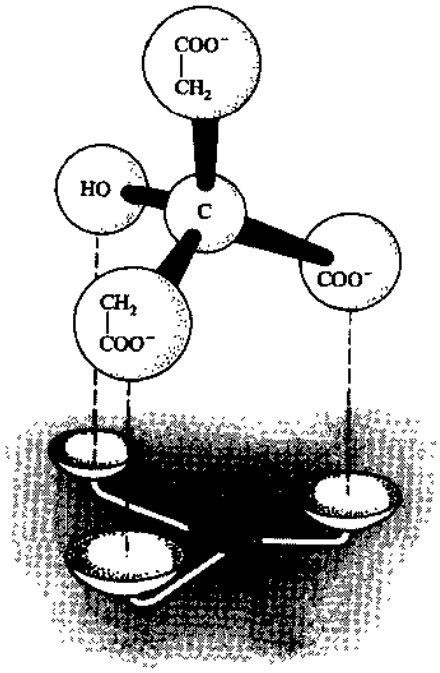


图12-12　柠檬酸与乌头酸酶的三点接附。图中显示了为何只能有一个$-CH_2COO^-$基团与酶相连接

12.5 柠檬酸是对称分子，在柠檬酸循环的第2步中，乌头酸酶催化了半个柠檬酸分子脱水，却不催化完全相同的另一半脱水。这如何解释？

答：

柠檬酸循环的发现者，Hans Krebs，也考虑过这一问题，并得出结论，即柠檬酸不是循环的中间物。1948年，Alexander Ogston提出了三点接附的假设，建立了原手征性的概念。若以三维结构表示柠檬酸分子（图12-12），假设它与乌头酸之间的三点接附对子催化作用是必要的，那么，很明显柠檬酸只能在一个方向上被接纳。因此，只可从对称分子的一半中脱去水。

12.6 若进行柠檬酸循环的细胞中包含有磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶，那么，怎样的过程能使1分子2-酮戊二酸氧化成5分子CO_2？

答：

理论上的反应顺序为：

2-酮戊二酸⟶（CO_2）+琥珀酰-CoA⟶延胡索酸⟶

苹果酸⟶草酰乙酸⟶（CO_2）+磷酸烯醇式丙酮酸⟶

丙酮酸⟶（CO_2）+乙酰-CoA⟶$2CO_2$

12.7 2-氟乙酸是在部分南部非洲植物中被发现的一种动物毒素；可被用做饵捕杀野兔（此毒素被称为“1080”）。食入该毒素后，它被转化为2-氟乙酰-CoA。2-氟乙酰-CoA在柠檬酸循环中有何去路？其毒性机制是什么？

答：

作为底物，2-氟乙酰-CoA与乙酰-CoA竞争柠檬酸合成酶，并被转化为

4－氟柠檬酸。4－氟柠檬酸作为顺乌头酸酶的有效抑制剂而阻断柠檬酸循环，以此产生毒性。

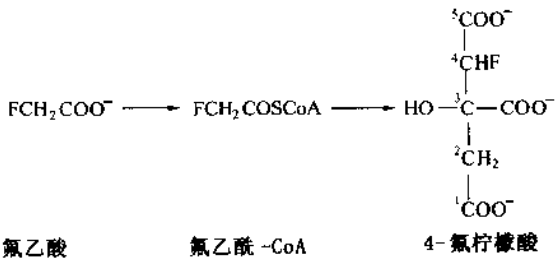


图 12－13　由 2－氟乙酰－CoA 合成 4－氟柠檬酸

丙酮酸脱氢酶复合体与丙酮酸羧化酶

12.8　在不消耗任何柠檬酸循环中间物的前提下，通过什么样的反应丙酮酸可被转化为琥珀酸？

答：

经丙酮酸脱氢酶复合体的作用，丙酮酸可被转化为乙酰－CoA。丙酮酸又可在丙酮酸羧化酶的催化下被羧基化而产生草酰乙酸。由此，2 分子的丙酮酸形成了柠檬酸的前体化合物，在柠檬酸循环中被转化为琥珀酸。

柠檬酸循环的两性特点

12.9　假设天冬氨酸是供给细胞的惟一碳源，请概述线粒体中柠檬酸循环得以进行的反应。

答：

天冬氨酸将会被转去氨基（见第 15 章）而产生草酰乙酸。草酰乙酸经下列一系列反应，被转化为乙酰－CoA：

$$\text{草酰乙酸}\xrightarrow{1}\text{苹果酸}\xrightarrow{2}\text{草酰乙酸}\xrightarrow{3}\text{磷酸烯醇式丙酮酸}\xrightarrow{4}\text{乙酰－CoA}$$

相应的酶分别是：①线粒体苹果酸脱氢酶；②细胞液苹果酸脱氢酶；③磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶；④丙酮酸激酶和丙酮酸脱氢酶。而后，乙酰－CoA 与草酰乙酸（由另一分子天冬氨酸产生而来）缩合，生成柠檬酸。所以，天冬氨酸能继续供给乙酰－CoA，以便柠檬酸循环能持续进行。

乙醛酸循环

12.10　乙醛酸循环与柠檬酸循环有多步反应是共同的，乙醛酸循环的两个特异的酶是什么？

答：

是异柠檬酸裂合酶与苹果酸合成酶。异柠檬酸裂合酶催化异柠檬酸断裂为琥珀酸和乙醛酸；苹果酸合成酶则催化乙醛酸与乙酰－CoA 缩合成苹果酸。

12.11　动物是不能由乙酰－CoA 净获得碳水化合物的，而植物却可以。如何解释？

答：

动物细胞中，乙酰－CoA 是丙酮酸在丙酮酸脱氢酶复合体的催化作用下，经过不可逆的脱羧反应而产生的。碳水化合物是由草酰乙酸合成的，而草酰乙酸又是丙酮酸在丙酮酸羧化酶的催化下生成的。由于丙酮酸脱氢酶催化的反应是不可逆的，则乙酰－CoA 不能被转化为丙酮酸，因此，动物细胞不能利用乙酰－CoA 获取碳水化合物。由于植物有乙醛酸循环，而动物没有，因而植物细胞可由 2 分子乙酰－CoA 和 1

分子草酰乙酸合成1分子琥珀酸与1分子苹果酸。苹果酸再被转化为草酰乙酸后，可与另1分子乙酰-CoA反应以便乙醛酸循环能持续进行。琥珀酸亦可经柠檬酸循环中酶的作用而被转化为草酰乙酸。故，1分子草酰乙酸可被用于碳水化合物的合成，由此，植物能够利用乙酰-CoA来净合成碳水化合物。

补充问题

12.12　计算2分子乙酰-CoA在（a）柠檬酸循环中，和（b）乙醛酸循环中由ADP底物水平磷酸化作用产生的ATP分子数。

12.13　延胡索酸的结构中有E（或称反式）双键。若细胞仅被供给延胡索酸的Z（或称顺式）异构体作为惟一的碳源，结果将如何？

12.14　缺氧对红细胞柠檬酸循环速率有何影响？

12.15　如将琥珀酰-CoA合成酶的有效抑制剂用于肝细胞或发芽的植物细胞，对这两类细胞碳水化合物的合成与能量生成有何影响？

第13章 脂类代谢

13.1 导言

人类摄取的饮食脂类主要来自于动植物的三酰甘油，固醇和膜磷脂。脂类代谢过程包括脂类的储存、降解，及产生各组织所需的结构功能特性脂质。例如，高级组织神经系统的进化就依赖于特异性酶的自然选择，这些酶可合成及降解（转换）脑和中枢神经系统的脂类。

13.2 脂类的消化

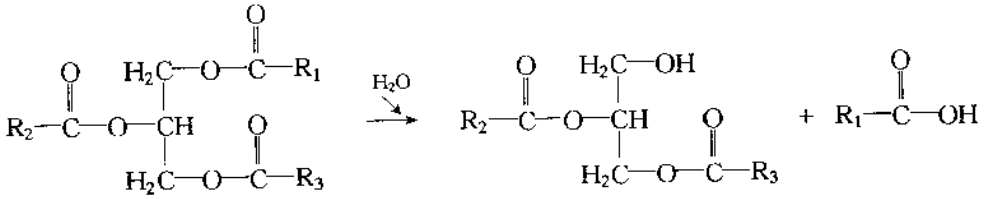
西方人每日约摄取 100g 的三酰甘油。这些脂类与摄入的磷脂一同依靠胰腺分泌液与胆囊分泌的胆汁而被消化吸收。胰腺分泌液的主要成分是酶，而胆汁的主要成分则是胆盐（见第 6 章）。

酶

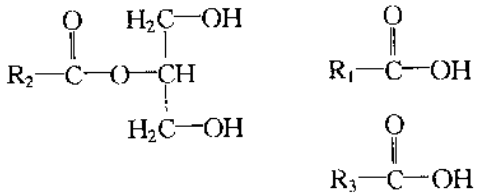
脂类的消化是在小肠内完成的，由分别作用于三酰甘油和磷脂的水解酶，脂酶与磷脂酶催化进行。

例 13.1

脂酶的催化作用：



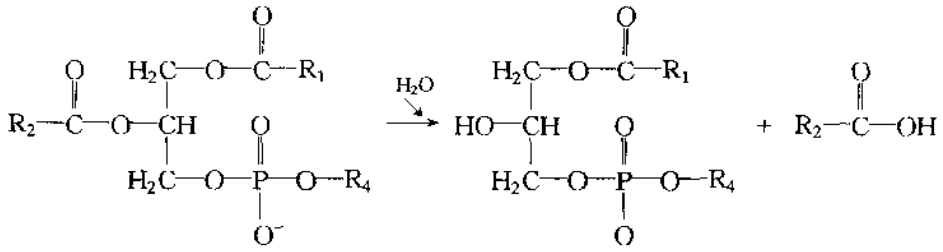
其中，R_1、R_2、R_3 是脂肪酸的碳氢链。脂肪酸与甘油之间的酯键被水解。肠腔中，胰脂酶对饮食三酰甘油的完全水解产生下列化合物：



2-单脂酰甘油　和　2 分子脂肪酸

例 13.2

磷脂酶 A_2 催化下列反应：



其中，R_1 和 R_2 是脂肪酸的碳氢链，R_4 是乙醇。脂肪酸与甘油之间的酯键只有一个被水解，特别是甘油中 C－2 位上的酯键易被水解。

磷脂酶 A_1 则水解磷酸甘油酯中 C－1 位上的脂肪酸与甘油之间的酯键。

问题：水解酶如何作用于疏水的脂类的?

这些脂酶必须能作用于水-脂界面。消化脂酶被分泌入小肠腔内，作用于大的脂肪滴上。经脂酶与磷脂酶的作用，最初的消化产物是脂肪酸和溶血磷酸甘油酯。由于大的脂肪滴被分散成无数小液滴，加速了消化进程。水解下来的脂肪酸和 2-单脂酰甘油增多，被胆盐微粒（见第 6 章）所吸收。单脂酰甘油也可增加胆盐的去油能力，因而使三酰甘油和脂溶性维生素更易乳化。大量的混合微团迁移至肠上皮细胞表面，在此脂肪酸、脂溶性维生素和 2-单脂酰甘油从微团中释出（图 13-1）。

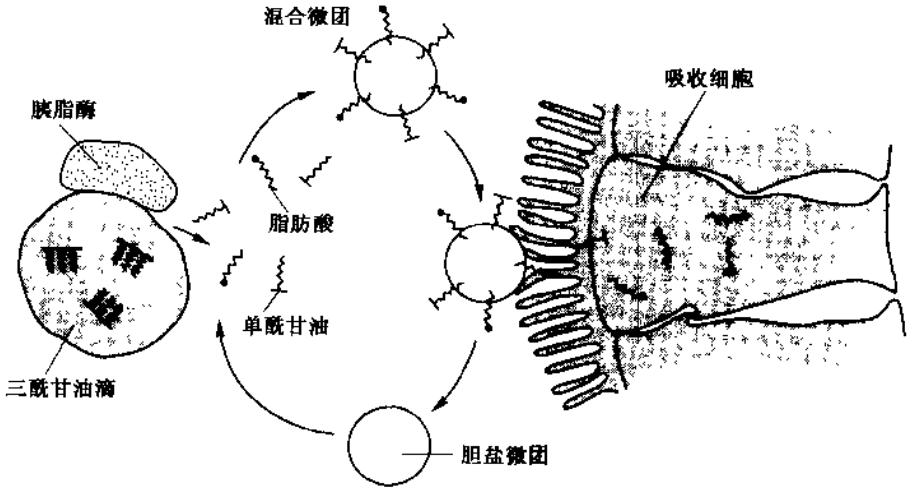


图 13-1　肠道内三酰甘油的消化

脂肪酸的吸收

脂肪酸的碳链由 14 或 14 个以上个碳原子（长链酸）组成时，该脂肪酸被动扩散入肠上皮细胞内。可顺着游离脂肪酸在混合微团中高而在肠上皮细胞内低的浓度梯度进入细胞。细胞膜不阻碍亲脂脂肪酸的进入。脂肪酸可通过与结合蛋白的结合而进入细胞内，结合蛋白对长链脂肪酸的亲和力较高。同时，与脂肪酸一起，2-单脂酰甘油也可被动扩散入上皮细胞，并被迅速转化为三酰甘油。

问题：脂肪酸和 2-单脂酰甘油是如何进入循环的？

新合成的三酰甘油被组合进乳糜微粒，乳糜微粒（一种脂蛋白，见下一部分）是由肠上皮细胞分泌入乳糜管和小肠绒毛内小淋巴管的。乳糜微粒从淋巴管进入胸导管，再由胸导管进入血液，将脂类燃料运送给各组织。乳糜微粒的代谢特点是能够将脂类燃料运输至肝外组织。

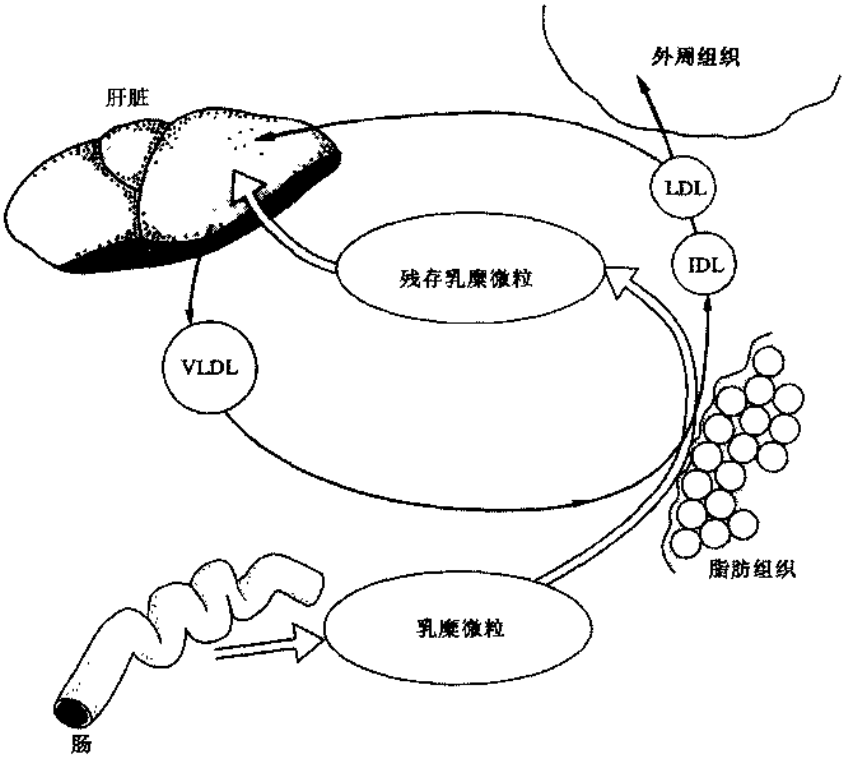


图 13-2　血液及组织中的脂蛋白循环

13.3　脂蛋白代谢

脂蛋白的作用

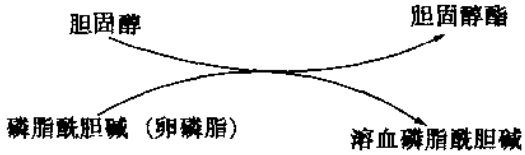
脂蛋白的作用是转运血浆中疏水的脂肪（图 13-2）。血液中循环利用的脂蛋白主要有乳糜微粒、VLDL（极低密度脂蛋白）、LDL（低密度脂蛋白）和 HDL（高密度脂蛋白）。IDL（中密度脂蛋白）是在 LDL 的形成过程中由 VLDL 衍生而来的。脂肪酸是细胞内的重要燃料，以三酰甘油的形式被储存于脂肪组织中。用于贮存脂肪的脂肪酸主要以乳糜微粒或 VLDL 中三酰甘油的形式被转运入脂肪组织。乳糜微粒在脂肪组织中被迅速降解，残存的乳糜微粒再进入循环中，被肝脏吸收。VLDL 在脂肪组织中被降解成为 LDL，而 LDL 则作为主要运输胆固醇的脂蛋白而循环。HDL 是可被不断循环利用的脂蛋白，它包含有可将游离胆固醇转化为胆固醇酯的磷脂酰胆碱：胆固醇酰基转移酶（或卵磷脂：胆固醇酰基转移酶，LCAT）。

问题：HDL 中胆固醇酯有何去路？

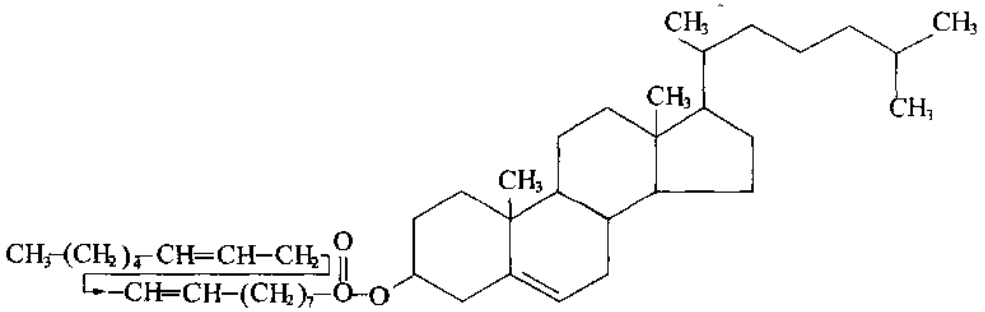
胆固醇酯通过胆固醇酯转运蛋白（CETP）而被转移出 HDL。CETP 促使胆固醇酯转移给 VLDL 与 LDL，而 HDL 交换得到三酰甘油。此途径中，CETP 使得 HDL 能够转运更多的由 LCAT 催化的反应而产生的胆固醇酯。

例 13.3

由 LCAT 催化的反应是：



亚油酸是一种脂肪酸，是由磷脂酰胆碱转移到胆固醇上而生成的胆固醇酯，即亚油酰胆固醇：



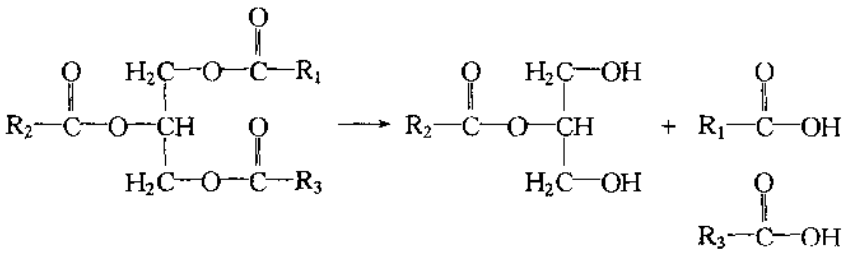
亚油酰胆固醇

脂蛋白中脂肪酸的释出

脂肪组织中脂蛋白脂酶的作用是从乳糜微粒和 VLDL 中去除三酰甘油。载脂蛋白 C 可激活此酶，使此酶特异性地作用于乳糜微粒与 VLDL 的表面。

问题：脂蛋白脂酶催化何种反应？

脂蛋白脂酶是胞外酶，可水解三酰甘油成为 2-单脂酰甘油和两个脂肪酸。而后脂肪酸沿浓度梯度被动扩散入细胞中。



三酰甘油　　2-单酰甘油　　游离脂肪酸

脂肪组织中，甘油三酯可由脂肪酸而再合成，以大脂肪滴形式贮存，这些大脂肪滴约占脂肪细胞体积的 96%（见第 1 章）。一个体重约 70kg 的人，其脂肪组织内贮存的脂肪足够供给长时间饥饿（40 天）状态下机体所需的能量。其他组织中脂蛋白脂酶也作为胞外酶，

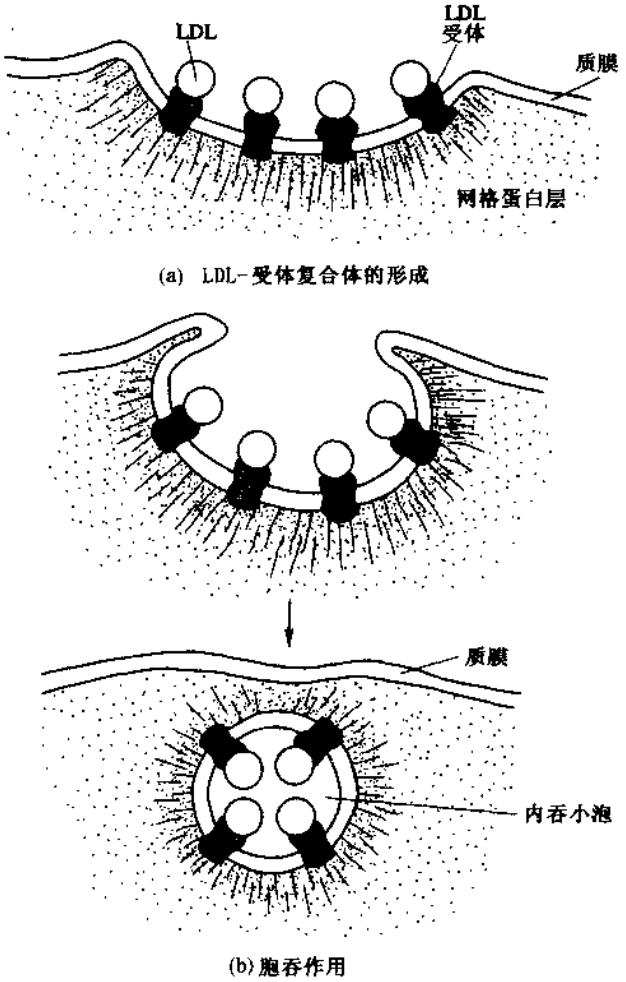
而由脂蛋白甘油三酯水解产生的脂肪酸，既可作为胞内的直接燃料，也可以甘油三酯形式贮存起来。

由 LDL 释出胆固醇

循环中 LDL 量充足时，可为组织提供内源性的胆固醇。

问题：LDL 中的胆固醇是如何转入细胞内的？

LDL 可特异性地与细胞表面的脂蛋白受体相结合，形成的复合体在质膜上被称为被覆陷窝的区域内变成簇团，随后发生胞吞作用（图 13－3）。网格蛋白包被从内吞泡上脱开，内吞泡可使受体再循环到质膜上或与溶酶体融合。溶酶体中的蛋白酶和脂酶能催化 LDL－受体复合体的水解；其中的蛋白质被完全降解为氨基酸，而胆固醇酯则被水解为游离胆固醇和脂肪酸。新的 LDL 受体在内质网膜上被合成，而后又被引导至质膜上。少量胆固醇被内质网膜所吸收，或在胞浆内经酯化以胆固醇酯的形式被贮存；这种情况是在胆固醇供给量超出其在膜中的利用量时才可发生。正常情况下，只有极少量的胆固醇酯存在于细胞内，游离胆固醇则主要存在于质膜内。



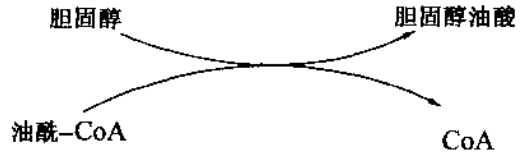
(a) LDL－受体复合体的形成

(b) 胞吞作用

图 13－3　胆固醇被吸收入细胞后 LDL－受体复合体的去路

例 13.4

乙酰-CoA：胆固醇酰基转移酶可催化胞浆内胆固醇的酯化：



LDL 受体

LDL 受体蛋白相对分子质量为 160 000，是一种膜内在糖蛋白，由 839 个氨基酸残基折叠成五个结构域。结构域 1 是可与载脂蛋白 B 或载脂蛋白 E 相作用的配体结合域，富含半胱氨酸，并带有负电荷。结构域 2 与上皮生长因子（EGF）的前体化合物高度同源，这一结构域的功能尚不清楚，但似乎对与 LDL 的结合有积极作用。结构域 3 有 *O*-连接的糖链，虽不知其功能，但它似乎起由细胞膜上将结合位点分离开的“柄”的作用。结构域 4 是跨膜结构域，可将受体固定在膜上。结构域 5 是处于胞浆内的一小段结构，可定位受体于被覆陷窝。

目前已鉴别出四类 LDL 受体的变异体。第一类变异体是由于使受体蛋白不表达而被鉴定的，也可能表达成了另一个修饰蛋白，但该蛋白并不作为 LDL 受体蛋白被识别。第二类变异体中出现了无义突变（造成蛋白质合成提前终止，参见第 17 章），导致由内质网向细胞膜运转的受体的减少。这类变异体在南非白种人群与黎巴嫩人群中常见。Watanabe 遗传性高脂血症兔子（WHHL）是带有第二类变异体的动物模型，被广泛应用于家族性高胆固醇血症的研究。第三类变异体导致受体与 LDL 异常结合，这可能是由于结构域 1 氨基酸序列的变化而引起的。第四类变异体是氨基酸序列有内在缺陷，使受体不能被定位在被覆陷窝上，是 C 端第 5 结构域氨基酸突变的结果。

问题：防止细胞内胆固醇过量蓄积的化学机理是什么？

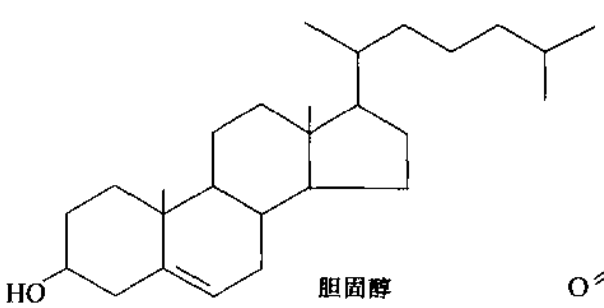
胞内过量的胆固醇可抑制 LDL 受体的合成，从而阻止细胞表面新受体的出现，这将使胆固醇的循环量增加。

例 13.5

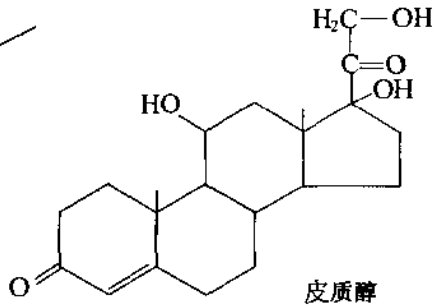
先天性家族性高胆固醇血症患者体内循环中胆固醇水平较高，是由于 LDL 受体的完全缺失或细胞表面缺陷受体的存在而造成的。

例 13.6

对胆固醇需要量大的组织，如肾上腺皮质，其细胞表面有大量的 LDL 受体。肾上腺中，胆固醇被用于合成类固醇激素，皮质酮（亦称氢化可的松）便是其中之一；由下列的结构式可知皮质酮与胆固醇结构的相似性：



胆固醇



皮质酮

13.4　贮存脂类的动员

当葡萄糖的可获得性较低时，以甘油三酯形式储存于脂肪组织中的脂肪酸便是各组织的主要能量来源。紧张、长时间运动及饥饿都会动用贮存脂类。甘油三酯可被激素敏感性脂肪酶水解，脂肪酸释出进入循环中。这些非酯化的脂肪酸与血浆白蛋白结合，随血液流经各组织。血浆白蛋白不仅使脂肪酸更易于进入循环，还可减低其在转运过程中的去污作用。

问题：激素敏感性脂肪酶对哪些激素敏感?

可将甘油三酯水解为甘油一酯和脂肪酸的激素敏感性脂肪酶可被下列激素激活：肾上腺素，去甲肾上腺素，肾上腺类固醇，胰高血糖素，垂体激素，催乳激素（亦称促乳素或黄体生成素），β-和 α-促脂解素，促生长素，促甲状腺素，及血管升压素等等。

问题：单脂酯甘油有何去路?

对激素并不敏感的第二个胞内酯酶可将甘油一酯水解为甘油与脂肪酸。

13.5　脂肪酸的氧化

脂肪酸的氧化分为三步进行，即，活化、转运入线粒体、氧化为乙酰-CoA。

脂肪酸的活化

一般情况下，脂肪酸在进入代谢途径之前要被转化为辅酶 A（CoASH）的衍生物；此脂酰基衍生物称为烷酰-CoA 或烯酰-CoA，该形式的脂肪酸被认为是已活化的。

$CH_3—(CH_2)_{14}—COO^-$　　$CH_3—(CH_2)_{14}—COSCoA$

软脂酸　→　软脂酰-CoA

（棕榈酸）　（棕榈酰-CoA）

$CH_3—(CH_2)_7CH═CH—(CH_2)_7—COO^-$　　$CH_3—(CH_2)_7CH═CH—(CH_2)_7—COSCoA$

硬脂酸　→　硬脂酰-CoA

（油酸）　（油酰 CoA）

脂肪酸的活化使脂肪酸与 CoA 之间生成了硫酯键。该过程与 ATP 水解为 AMP 的反应偶联。对于棕榈酸，反应式如下：

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}COO^- + CoASH + ATP \rightarrow CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}COSCoA + AMP + PPi$$

催化此反应的酶是脂酰-CoA 合成酶。

有三种脂酰-CoA 合成酶能够激活不同链长的脂肪酸。一种可激活乙酸（C_2）、丙酸（C_3）和丁酸（C_4）；第二种酶可激活中等链长的脂肪酸（$C_4 \sim C_{12}$）；第三种可激活长链或中等链长的脂肪酸。活化长链脂肪酸的脂酰-CoA 合成酶广泛存在于哺乳动物组织中，主要在线粒体与内质网内。

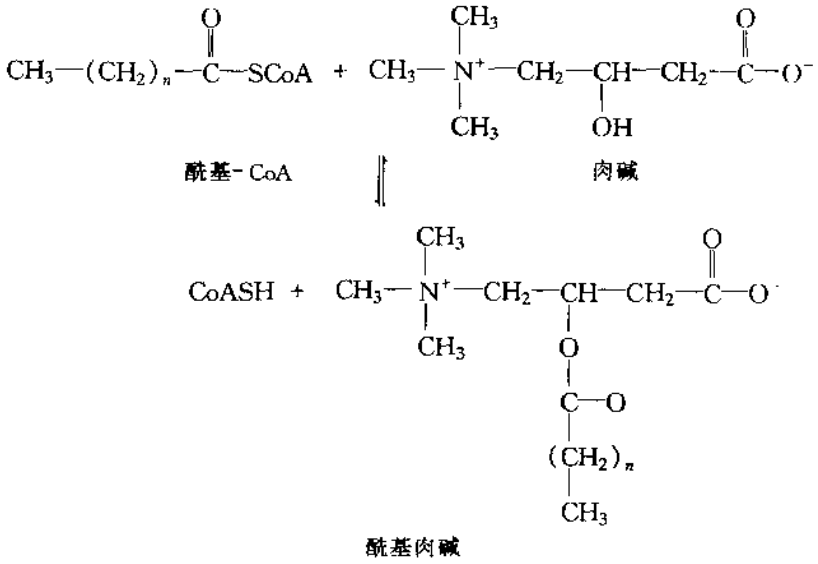
活化的脂肪酸向线粒体内的转运

氧化脂肪酸的酶存在于线粒体基质中。脂酰-CoA 虽不能自由地透过线粒体内膜，但经特异的转运蛋白的运载，脂酰基链可进入线粒体基质。

例 13.7

肉碱是脂酰基团的载体，可以转运脂肪酸进出线粒体基质（图 13-4）。在线粒体内膜

上肉碱酰基转移酶的作用下，脂酰基团经酯化反应与肉碱的羟基相连接。



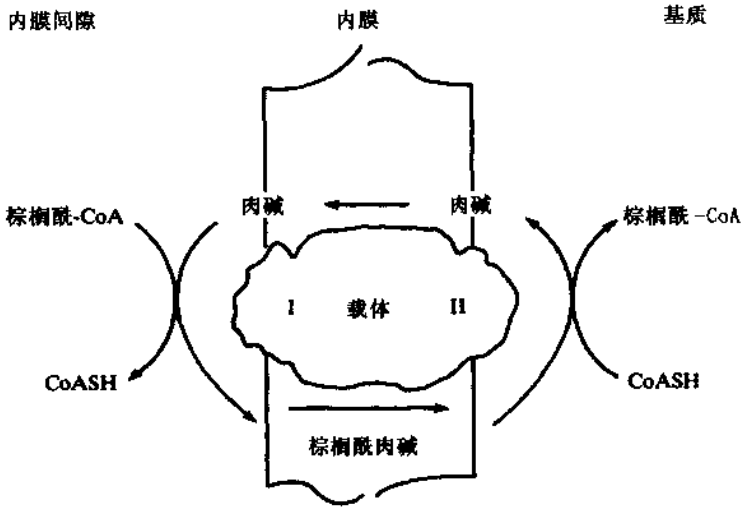


图 13-4　细胞液与线粒体基质之间棕榈酰基团的转运过程。Ⅰ与Ⅱ都是肉碱棕榈酰转移酶。载体运载棕榈酰肉碱跨入内膜，游离肉碱被转运出内膜外。游离 CoA 则不能被转运

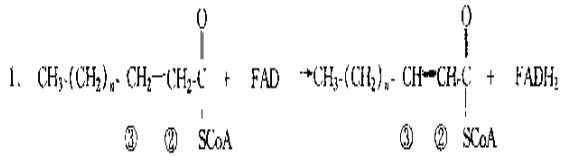
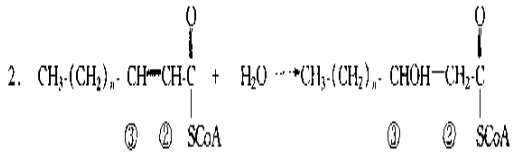
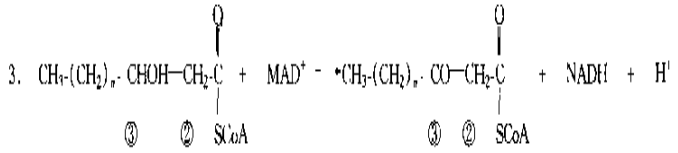
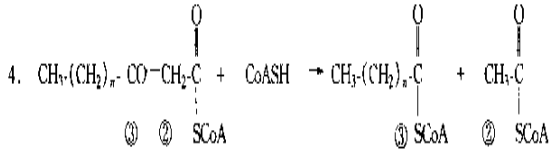
脂肪酸的 β-氧化

脂肪酸脂酰-CoA 衍生物的 β-氧化是，脂肪酸脂酰基链上每次减少一个两碳单位，氧化过程中只生成单一产物乙酰-CoA（图 13-5）。脂酰基链的切断在 C-2 与 C-3 之间的 b 键上，切下的分子被氧化。表 13.1 列出了图 13-5 中所示的脂肪酸的 β 氧化反应及催化酶。

问题：β-氧化过程中产生的 FADH2 和 NADH 会有何变化？

脂酰-CoA 脱氢酶是与黄素相关的膜被酶，与线粒体呼吸复合体连接在一起。$FADH_2$ 一经产生，就会被呼吸链（见第 14 章）氧化。羟酰-CoA 脱氢酶存在于线粒体基质中，由此酶作用于羟酰-CoA 化合物而产生的 NADH 将补充线粒体基质的 NADH 池，也可被呼吸链（见第 14 章）氧化。

表 13.1 脂肪酸的β-氧化反应

反　应	酶
1. 	脂酰-CoA 脱氢酶
2. 	烯酰-CoA 水合酶
3. 	3-羟酰-CoA 脱氢酶
4. 	硫解酶

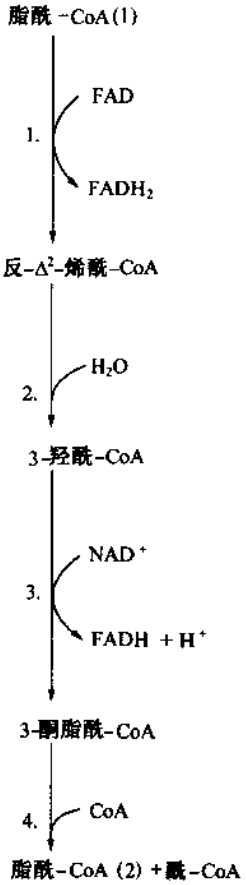


图 13－5　β-氧化的代谢途径；脂肪酸中第一个两碳单位的去除。若脂酰-CoA（1）是软脂酰-CoA，则脂酰-CoA（2）为豆蔻酰-CoA。要完成软脂酰-CoA 的 β-氧化就需要重复 7 次图中所示的断键过程，产生 8 分子乙酰-CoA。箭头左边的数字与表 13.1 中反应的编号一致

13.6　由脂肪酸产生的乙酰-CoA 的去路：生酮作用

乙酰-CoA 在柠檬酸循环（见第 12 章）中被氧化为 CO_2，产生的能量用于 β-氧化过程。仅在肝细胞线粒体中，乙酰-CoA 可被转化为酮体：

$CH_3COCH_2COO^-$　　CH_3COCH_3　　$CH_3CHOHCH_2COO^-$

乙酰乙酸　　丙酮　　3-羟基丁酸

表 13.2 和图 13－6 给出了上述化合物的反应与生物合成途径。

酮体可由肝脏不断释出，是水溶的脂质燃料。组织中碳水化合物充足，易于获得葡萄糖时，在体内循环的酮体量较少（~0.1mmolL^{-1}）。脂肪组织中大量甘油三酯的水解反映整个机体能量需求的加大，肝脏及其他组织中脂肪酸的氧化速度也会加快。这便使肝脏的生酮作用加强，循环中酮体浓度增加。例如运动时，血液中酮体浓度逐渐上升，可达 2～3 mmolL^{-1}，甚至能与血糖浓度相比较。

正常情况下，部分乙酰乙酸可被转化为 3-羟基丁酸。乙酰乙酸和 3-羟基丁酸是可被骨骼肌与心肌利用的燃料，估计可提供这两种组织 10% 日需量的能量。

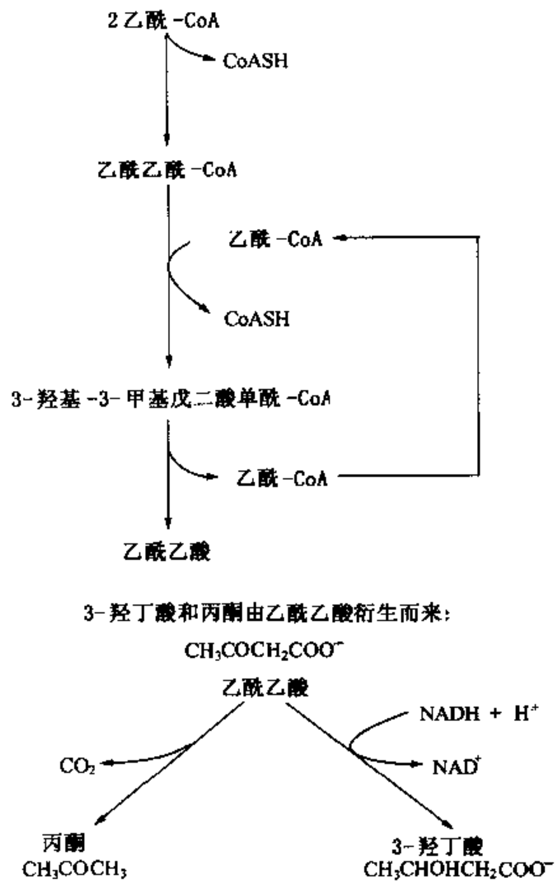


图 13-6　酮体的合成途径：生酮作用。表 13.2 列出了本图所示的乙酰乙酸与 3-羟基丁酸生成过程的反应式和催化酶

表 13.2　生酮作用

反　应	酶
1. $2CH_3COSCoA \rightarrow CH_3COCH_2COSCoA$	乙酰-CoA 乙酰转移酶
2. $CH_3COCH_2COSCoA + CH_3COSCoA \rightarrow$ $^-OOCCH_2C(CH_3)(OH)CH_2COSCoA + CoASH$	羟甲戊二酸单酰-CoA 合成酶
3. $^-OOCCH_2C(CH_3)(OH)CH_2COSCoA \rightarrow$ $^-OOCCH_2COCH_3 + CH_3COSCoA$	HMG-CoA 裂合酶
4. $CH_3COCH_2COO^- + NADH + H^+ \rightarrow$ $CH_3CHOHCH_2COO^- + NAD^+$	3-羟丁酸脱氢酶

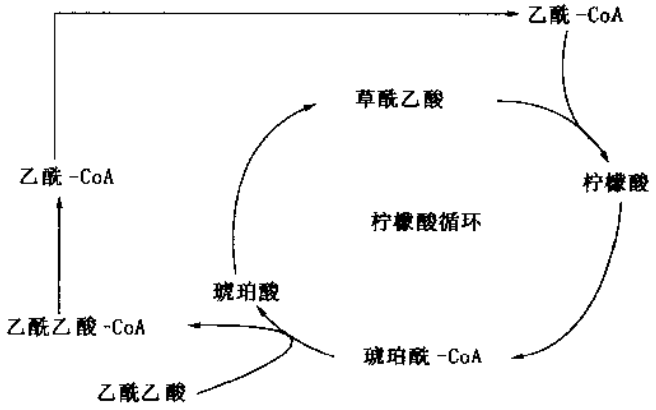


图 13-7　乙酰乙酸的利用途径

问题：乙酰乙酸产生的能量是如何被用于肌肉的机械运动的？

肌细胞线粒体中的 3-酮酸转移酶可将乙酰乙酸转化为乙酰乙酰-CoA；但肝细胞线粒体中缺乏此酶。所生成的乙酰乙酰-CoA 经存在于各组织细胞线粒体中的硫解酶的催化裂解为乙酰-CoA（图 13-7）。

13.7　脂肪的生成

饮食碳水化合物供给过量时，多余的碳水化合物可被转化为甘油三酯；一些摄入低脂食物的个体也能将葡萄糖转化为甘油三酯而贮存起来。这一过程被称为脂肪的生成，包括先由乙酰-CoA 合成脂肪酸，及脂肪酸酯化产生甘油三酯。主要的脂肪合成组织是肠道、肝脏与脂肪组织。哺乳期妇女的乳腺也因不断需求葡萄糖以合成乳脂而成为脂肪合成的主要组织。

软脂酸的合成

软脂酸是由乙酰-CoA 于细胞液中合成而来的。当葡萄糖充足且线粒体基质中柠檬酸的量超出了柠檬酸循环的需求时，剩余的柠檬酸就会被转运出线粒体进入细胞液中（图13-8）。脂肪酸合成中乙酰基团的来源即细胞液中的柠檬酸，其代谢过程包括下列酶促反应：

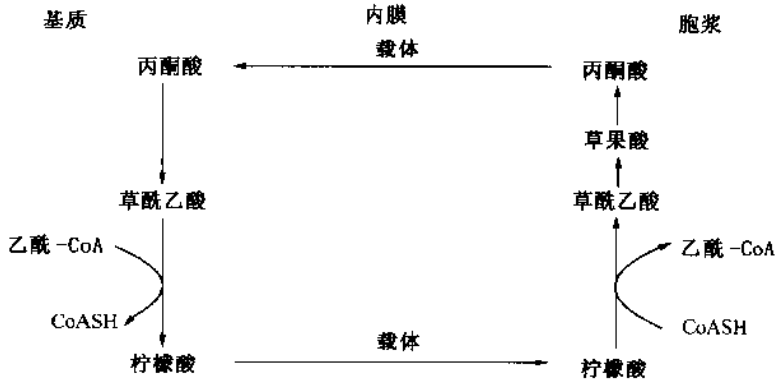


图 13-8　乙酰基团由线粒体向细胞液中的转运

(a) 柠檬酸裂合酶

$$\begin{array}{l} H_2CCOO^- \\ | \\ HOCCOO^- \\ | \\ H_2CCOO^- \end{array} + CoASH + ATP^{4-} \rightarrow {}^-OOCCH_2COCOO^- + CH_3COSCoA + ADP^{3-} + P_i^{2-}$$

柠檬酸　　草酰乙酸　　乙酰-CoA

(b) 苹果酸脱氢酶（1）

$$OOCCH_2COCOO^- + NADH + H^+ \rightarrow {}^-OOCCH_2HCOHCOO^- + NAD^+$$

草酰乙酸　　苹果酸

(c)（草酰乙酸脱羧）（$NADP^+$）苹果酸脱氢酶（2）

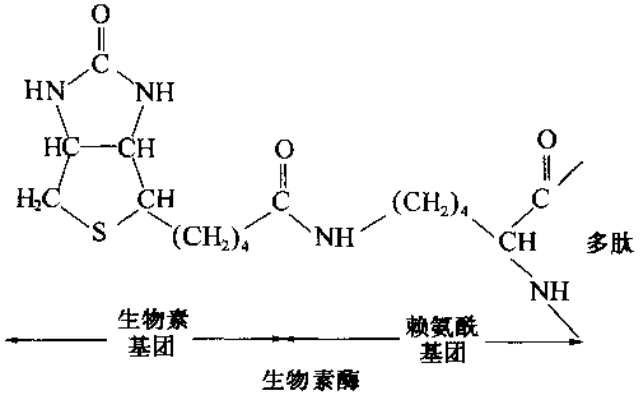
$$OOCCH_2HCOHCOO^- + NADP^+ \rightarrow CH_3COCOO^- + CO_2 + NADPH$$

苹果酸　　丙酮酸

关于丙酮酸向草酰乙酸的转化及线粒体中柠檬酸的形成，可参见第 12 章。脂肪酸合成过程中乙酰-CoA 可经乙酰-CoA 羧化酶的催化而转化为丙二酸单酰-CoA。7 分子的乙酰-CoA 被转化为丙二酸单酰-CoA 以合成 1 分子的软脂酸。

例 13.8

在乙酰-CoA 羧化酶催化丙二酸单酰-CoA 生成的过程中，作为辅基与酶紧密相连的生物素是羧基的载体，此羧基将被转移至乙酰-CoA 上。



正常情况下，乙酰-CoA 羧化酶是以无活性的原聚体存在于细胞液中的，$M_r = 2\times10^5$。柠檬酸引发原聚体聚合成有活性的长丝状的多功能酶，$M_r = 4.8\times10^6$。

活化的乙酰-CoA 羧化酶又可激活二氧化碳，将羧基转化给乙酰-CoA 而形成丙二酰-CoA：

$$HCO_3^- + ATP + 生物素\text{-}酶 \rightarrow {}^-OOC\text{-}生物素\text{-}酶 + ADP + Pi$$

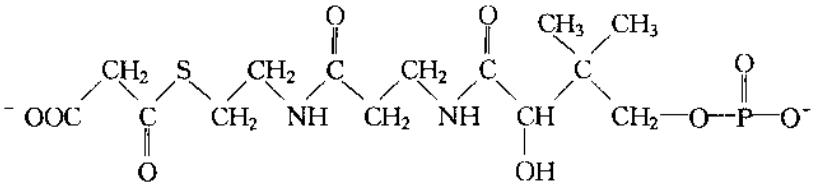
$$CH_3COSCoA + {}^-OOC\text{-}生物素\text{-}酶 \rightarrow {}^-OOCCH_2COSCoA + 生物素\text{-}酶$$

总反应式：乙酰-CoA + HCO_3^- + ATP→丙二酸单酰-CoA + ADP + Pi

丙二酸单酰-CoA 的生成标志着软脂酸（$C_{16:0}$）合成的开始。合成过程是在多功能酶复合体，脂肪酸合成酶上进行的。哺乳动物肝细胞中，多功能酶复合体由两条相同的多肽链组成，每一多肽链都有丙二酸单酰基团与烷酰基团的特异结合位点，共有 8 种不同的活性。

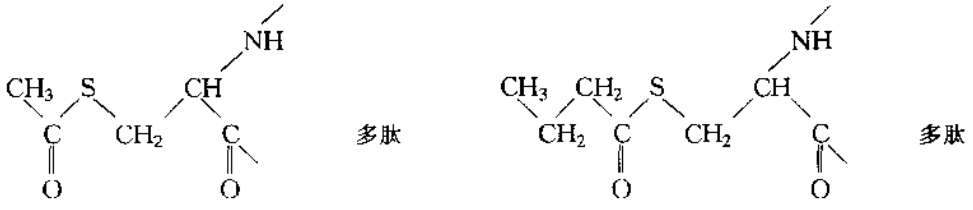
丙二酸单酰与烷酰基团在脂肪酸合成酶上的结合位点如下：

(a) 磷酸泛酰巯基乙胺（PP）结合丙二酸单酰或乙酰基团：



苹果酰磷酸泛酰巯基乙胺

(b) 半胱氨酸只结合烷酰基团：



乙酰半胱氨酰　　丁酰半胱氨酰

一旦乙酰基团或丙二酸单酰基团结合到脂肪酸合成酶上，便进行软脂酸合成中酶催化反应的7个循环，而后，软脂酸自多功能酶复合体上脱离开。总反应式为：

1 乙酰-CoA + 7 丙二酸单酰-CoA + 14NADPH + $14H^+$ →

软脂酸 + 8CoASH + $14NADP^+$ + 7 H_2O + 7 CO_2

表 13.3 列出了每一酶促反应。

表 13.3　脂肪酸合成酶复合体上的酶促反应

反　应	酶
1. $CH_3COSCoA + HS\text{-}PI \xrightarrow[CoASH]{} CH_3\text{-}CO\text{-}S\text{-}PP$	乙酰转酰基酶
2. $CH_3COS\text{-}PP + HS\text{-}Cys \longrightarrow CH_3COSCys + HS\text{-}PP$	乙酰转酰基酶
3. $^-OOCCH_2COSCoA + HS\text{-}PP \xrightarrow[CoASH]{} {}^-OOCCH_2COS\text{-}PP$	苹果酰转酰基酶
4. $CH_3COS\text{-}Cys + {}^-OOCCH_2COS\text{-}PP \rightarrow HS\text{-}Cys + CH_3COCH_2COS\text{-}PP + CO_2$	β-酮脂酰合成酶
5. $CH_3COCH_2COS\text{-}PP \xrightarrow[NADPH+H^+\ NADP^+]{} CH_3CHOHCH_2COS\text{-}PP$	β-酮脂酰还原酶
6. $CH_3CHOHCH_2COS\text{-}PP \xrightarrow[H_2O]{} CH_3CH{=}CHCOS\text{-}PP$	β-羟酰脱水酶
7. $CH_3CH{=}CHCOS\text{-}PP \xrightarrow[NADPH+H^+\ NADP^+]{} CH_3CH_2CH_2COS\text{-}PP$	烯酰还原酶
8. $CH_3CH_2CH_2COS\text{-}PP \rightarrow CH_3CH_2CH_2COS\text{-}Cys$	酰基转酰基酶
反回到第 4 步，与苹果酰-S-PP 缩合 6 次。	
9. $CH_3(CH_2)_{14}COS\text{-}PP + H_2O \rightarrow CH_3(CH_2)_{14}COO^- + H^+ HS\text{-}Cys$	棕榈酰硫酯酶

问题：软脂酸合成中用于还原反应的 NADPH 从何而来？

乙酰基团自线粒体转入细胞液的过程中，当苹果酸被氧化为丙酮酸和二氧化碳时会产生 NADPH（见图 13-8 及文中的（c）反应）。葡萄糖被氧化并脱羧为 5-磷酸核酮糖时（见第 11 章），亦可产生 NADPH。

不饱和脂肪酸的合成

软脂酸可经加长碳链而被转化为硬脂酸（$C_{18:0}$）。硬脂酸的去饱和则可产生油酸（$C_{18:1}\Delta 9$）。哺乳动物组织不能合成亚油酸（$C_{18:2}\Delta 9,12$）。然而亚油酸却是动物体的必需脂肪酸，需从饮食中获取；它有两个重要的代谢功能。一方面可保持膜脂质、脂蛋白的流动性，并贮存脂质。另一方面，它又是在前列腺素（见 13.9）形成过程中起特殊作用的花生四烯酸的前体。

问题：亚油酸转化为花生四烯酸的过程中有几个步骤？

参见图 13－9。亚油酸碳链上的 C－6 被脱氢去饱和生成 γ-亚麻酸。γ-亚麻酸上增加一个二碳单位，再在 C_{20} 链的 C－5 位上形成另一个双键，便转化成了花生四烯酸。

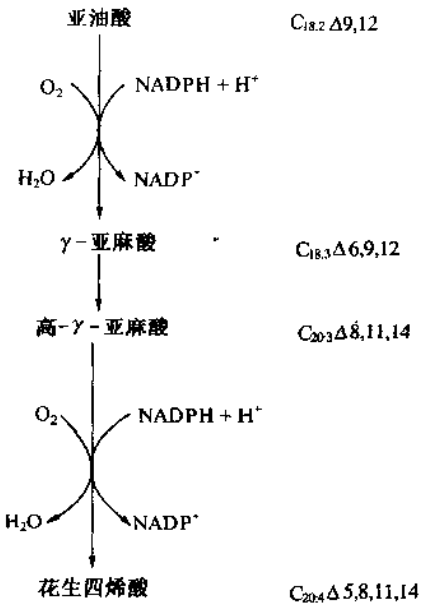
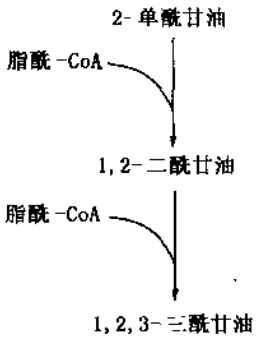


图 13－9　亚油酸合成花生四烯酸

甘油三酯的合成

甘油三酯是在内质网（EP）中合成的。在肝脏与脂肪组织细胞内，胞液中由饮食或软脂酸的重头合成而获取的脂肪酸插入内质网膜中。甘油三酯的合成反应如图 13－10 所示。膜被的脂酰－CoA 合成酶激活了两个脂肪酸，膜被的脂酰－CoA 转移酶催化这两个脂肪酸与 3－磷酸甘油酯化，生成磷脂酸。在膜中，磷脂酸磷酸酶水解磷脂酸释出磷酸，以便1,2－二酰甘油与第三个脂肪酸分子发生酯化反应。

肠道内，甘油三酯的合成也在内质网膜上进行，脂肪酸与 2－单脂酰甘油发生如下的酯化反应：



脂肪酰－CoA ＋ 3－磷酸甘油 $\xrightarrow{\text{第 1 步}}$ 磷脂酸 $\xrightarrow{\text{第 2 步}}$ 甘油二酯 $\xrightarrow{\text{第 3 步}}$ 甘油三酯

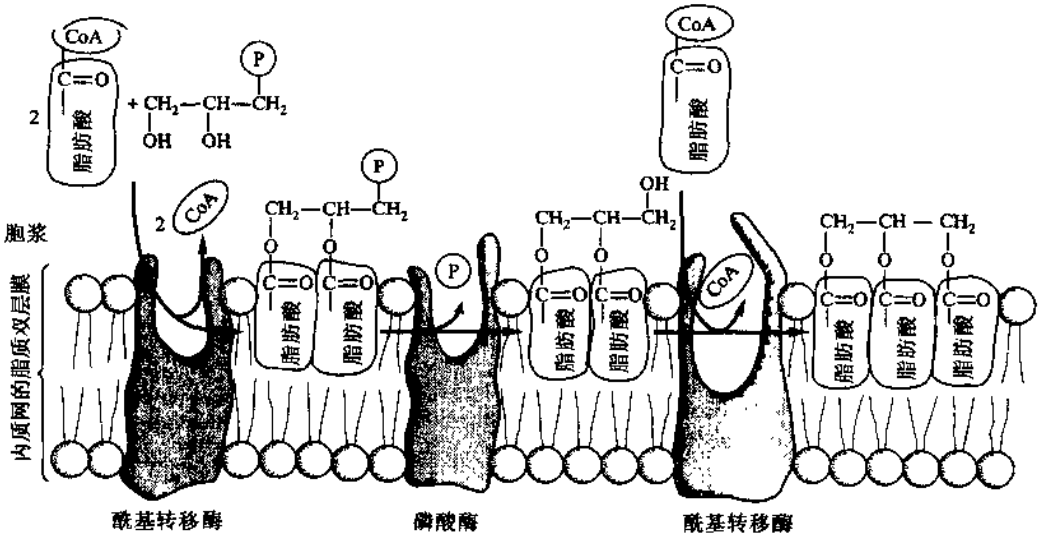


图 13－10　肝细胞与脂肪细胞内质网中甘油三酯的合成

甘油三酯与膜磷脂之间无任何极性作用，甘油三酯合成后既可以小脂肪滴被释入细胞液中，也可被释入内质网腔内。脂肪细胞内，胞液中的脂肪滴可聚集，向一起迁移，融合成大的中心脂肪滴。在肝脏与肠道内，甘油三酯被包被入脂蛋白（分别为 VLDL 和乳糜微粒）中，随后分泌进入循环（图 13－11）。

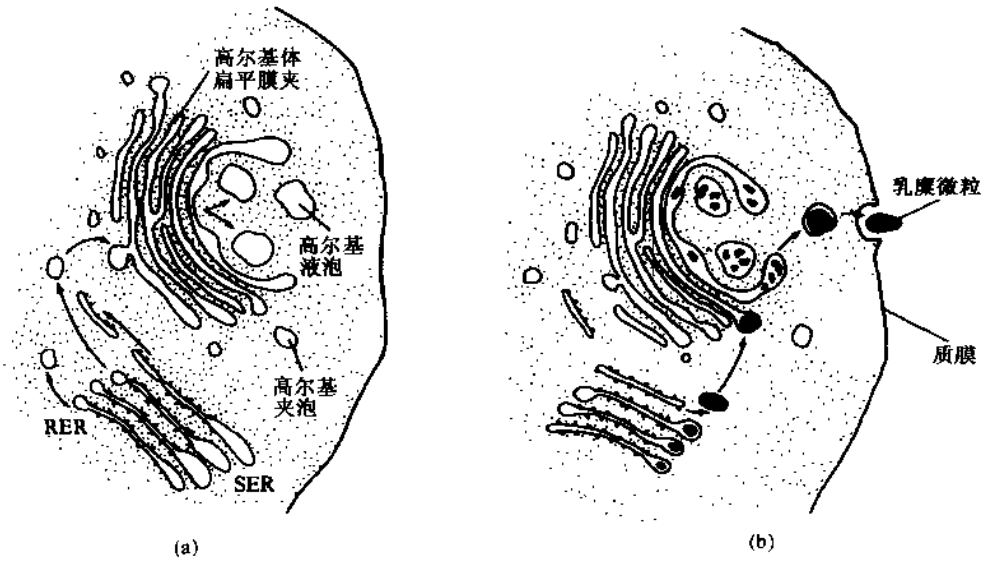


图 13－11　乳糜微粒与 VLDL 的分泌：(a) 禁食 24h 的大鼠；(b) 给予脂肪饮食 15～60min 后的大鼠

13.8　磷脂与鞘脂类的合成

磷脂

磷脂酰胆碱，是膜与脂蛋白的主要磷脂组分，在肝细胞内被从头合成。合成过程在内质网上进行，经 1，2－二酰甘油而与三酰甘油的合成相连通。磷脂酰胆碱的合成中，三个重要的化合物是：

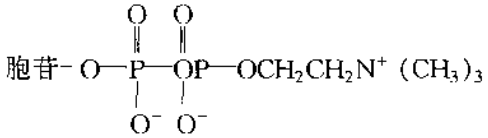
1. 胆碱

$$HOCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$$

2. 磷酸胆碱

$$^{2-}O_3POCH_2CH_2N^+(CH_3)_3$$

3. 胞苷二磷酸胆碱（CDP-胆碱）



磷脂酰胆碱的合成如图 13-12 所示。

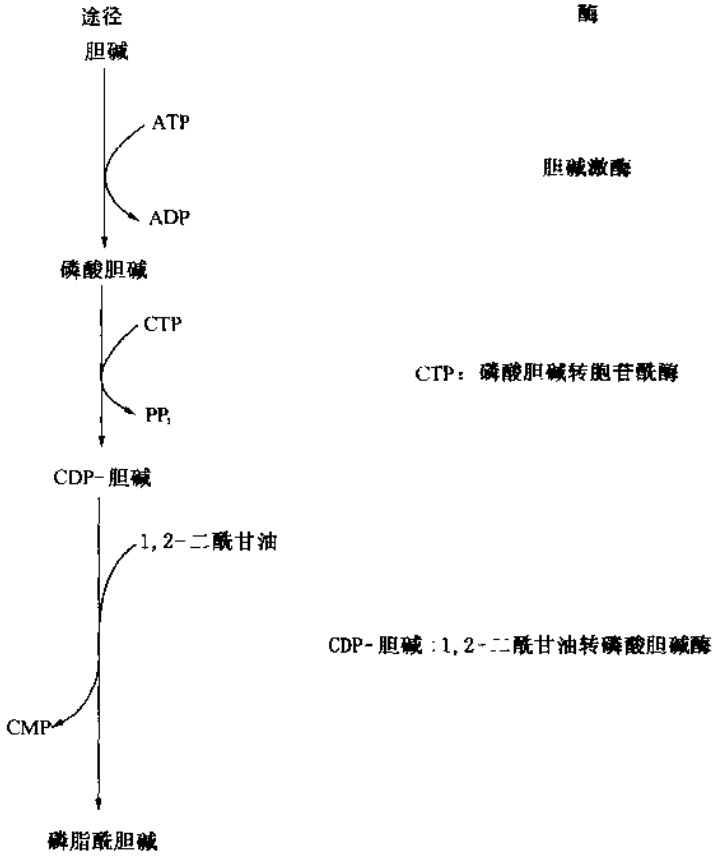


图 13-12　磷脂酰胆碱的合成

例 13.9

特别要指出的是在磷脂合成中 CDP-胆碱：1,2-二酰甘油转移酶与甘油三酯合成中的脂酰-CoA 转移酶拥有共同的底物，1,2-二酰甘油；两条合成途径如图 13-13 所示。

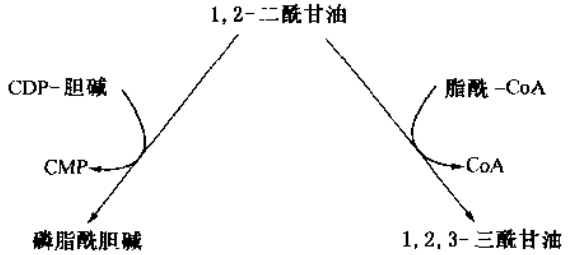


图 13-13　磷脂酰胆碱与1,2,3-三酰甘油的合成

磷脂酰乙醇胺是被重头合成的，合成方式类似于磷脂酰胆碱。磷脂酰丝氨酸与磷脂酰胆碱可由磷脂酰乙醇胺而生成。

例 13.10

磷脂酰丝氨酸是由磷脂酰乙醇胺中的乙醇胺残基换成了丝氨酰基团而产生的。磷脂酰丝氨酸中丝氨酸的脱羧可再生成磷脂酰乙醇胺。经三次有效的甲基化作用，磷脂酰乙醇胺可被转化为磷脂酰胆碱。*S*-腺苷甲硫氨酸是甲基基团的供体（见第 15 章）（图13-14）。

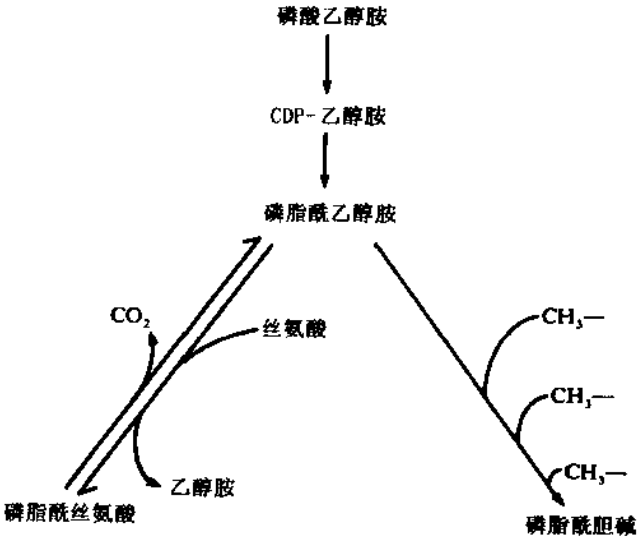


图 13-14　由磷酸乙醇胺合成磷脂酰丝氨酸与磷脂酰胆碱

鞘脂

鞘脂包括糖脂（神经节苷脂和脑苷脂）、磷脂及鞘磷脂。这些化合物也都是膜的重要组成成分。鞘脂的生物合成与常见的神经酰胺中间体有关（图 13-15）。

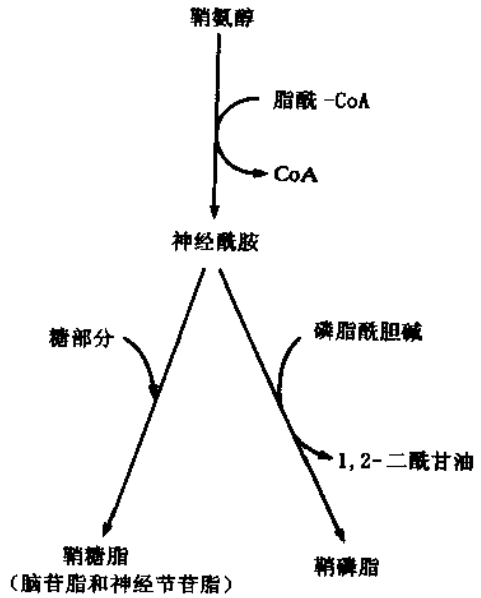


图 13-15　鞘脂的合成途径

磷脂与鞘脂的降解

组织的生长和发育过程中，细胞内容物被不断地降解与再合成。膜脂质可被溶酶体中的酶所降解。

问题：溶酶体中（a）磷脂酰胆碱和（b）鞘磷脂水解以怎样的顺序进行？

下列反应可按任意顺序进行：

(a) 1. 磷脂酶 A_1 水解去除 1 个脂肪酸。

2. 磷脂酶 A_2 水解去除 1 个脂肪酸。

3. 磷脂酶 C 水解去除磷酸胆碱。

4. 磷脂酶 D 水解去除胆碱。

(b) 1. 鞘磷脂酶水解去除了鞘磷脂中的磷酸胆碱。

2. 神经酰胺酶水解去除了神经酰胺上的脂肪酸。

脑苷脂（神经酰胺单糖）是脑及中枢神经系统组织细胞的重要的膜成分，神经节苷脂（包括唾液酸在内的神经酰胺寡糖）则作为细胞表面受体与多种配体和激素结合从而在各组织中起到重要作用。目前已知人类患有 10 种因鞘脂不能顺利降解而引起的脂沉积症。鞘脂不能降解即导致鞘脂的蓄积，随后发生组织的肿胀及功能紊乱；对年轻患者可致早逝。这些疾病的共同症状是智力迟钝（表 13.4），这强调了神经组织中鞘脂的分解与再合成的重要性。视网膜、肝脏与脾脏都会受到影响。这类疾病是遗传病，因遗传缺陷而导致水解酶活性的降低。

表 13.4　某些脂沉积症的临床病症

疾病名称	症　状
Gaucher 病	脾脏与肝脏肿大
	长骨与骨盆糜烂
	智力迟钝（仅见于婴幼儿期）
Niemann-Pick 病	肝、脾肿大
	智力迟钝
	约 30% 患者视网膜上有红斑
异染性脑白质障碍症	智力迟钝
	成人期表现出心理障碍
	以甲苯紫染料染色可见黄棕色神经细胞

例 13.11

已发现人体内约有 30 种不同的神经节苷脂，图 13-16 列出了主要的神经节苷脂的降解途径，并标明了各降解步骤所需的酶的名称及由于缺乏特异性酶而致的疾病名称。

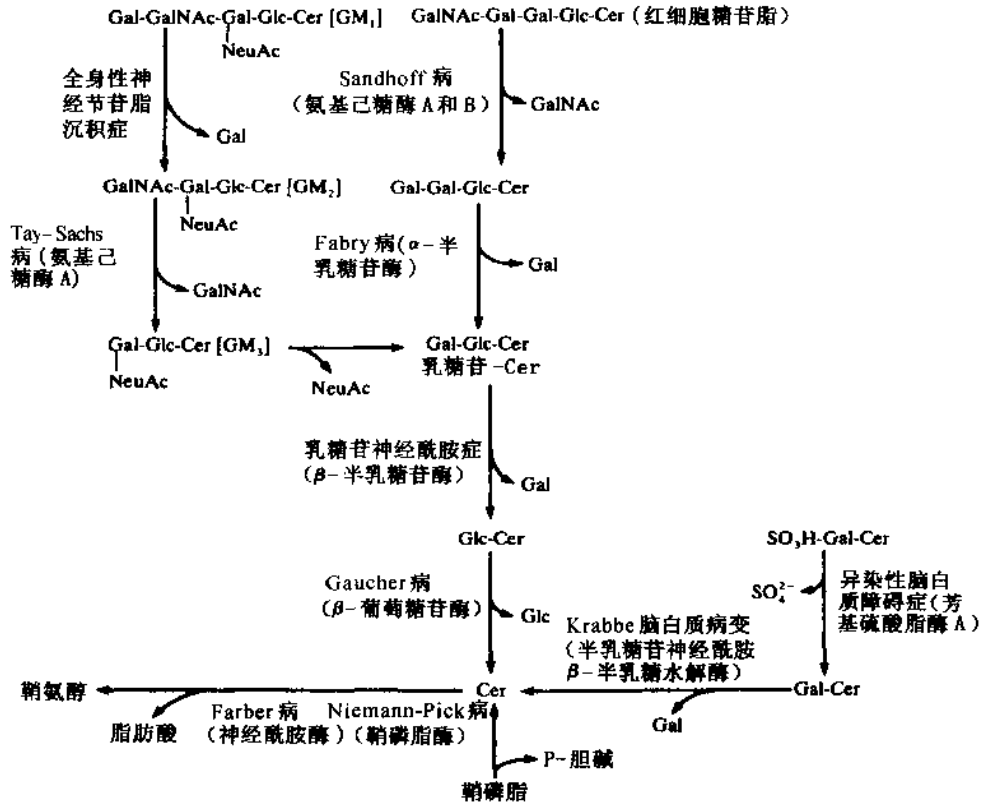


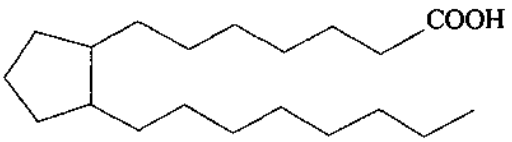
图 13-16　Cer = 神经酰胺；Gal = 半乳糖基；Glc = 葡萄糖基；GalNAc = *N*-乙酰半乳糖氨酰基；NeuAc = *N*-乙酰神经氨酰基；GM_1、GM_2、GM_3 分别 = 1 型、2 型、3 型单唾液酰神经节苷脂。圆括号中列出了每一种疾病所缺乏的特异性酶

13.9　前列腺素

结构与命名

前列腺素是 20C 的不饱和羟酸，带有一个取代的环戊烷环与两个脂肪族侧链。

前列腺素的碳骨架结构为：

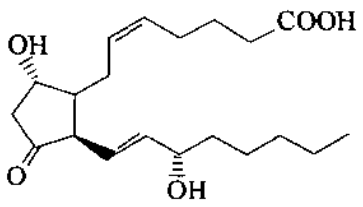


前列腺烷酸

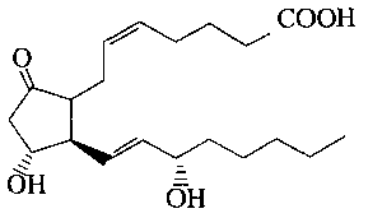
各种前列腺素都可被缩写，prostaglandin 被缩写成 PG，其后续上（A～I）的第三个字母，以示环戊烷环上取代基的性质。下标数字则表示脂肪链中双键总数。

例 13.12

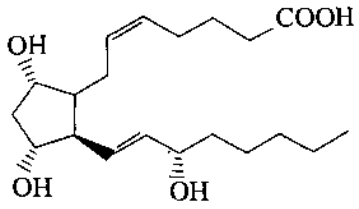
某些前列腺素的结构与简称如下：



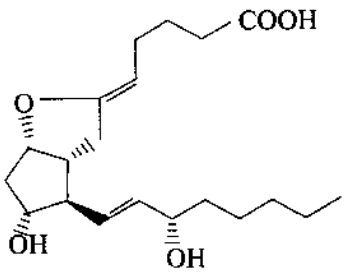
PGD_2



PGE_2



PGF_2



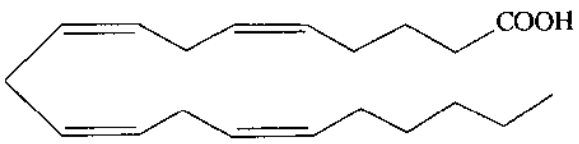
PGI_2
（也称前列环素）

前列腺素的生物学作用

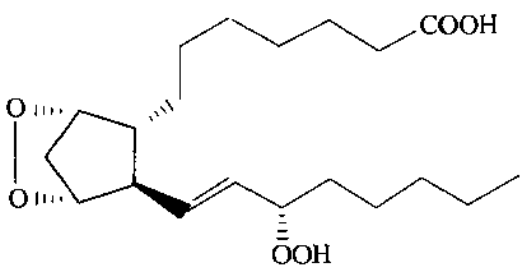
前列腺素虽存在于所有组织中，但量甚微。其对于合成它们的细胞有多种生物学功能；例如，对女性在排卵期、月经期、妊娠期及分娩期时的生殖系统都有作用，并可刺激子宫收缩。

前列腺素的合成

前列腺素是由细胞膜磷脂在代谢途径中产生的花生四烯酸合成，如图 13－17 所示。花生四烯酸 $C_{20:4}\Delta 5,8,11,14$ 碳链中的双键使脂肪酸非常易于被氧所氧化。环加氧酶催化花生四烯酸碳链 C－8 和 C－11 双键区域内的环化与氧的加入，如下所示：



花生四烯酸



前列腺素 G_2
(PGG_2)

环加氧酶是存在于内质网膜上的前列腺素合成酶的组成部分。

原前列腺素 PGG_2 的生物合成引发了大量的化学相关的次级化合物的生物合成。

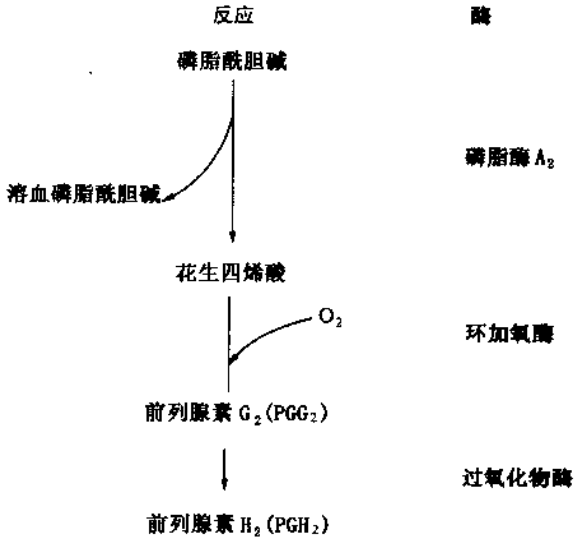


图 13－17

例 13.13

图 13－18 列出了前列腺素之间的相互联系。

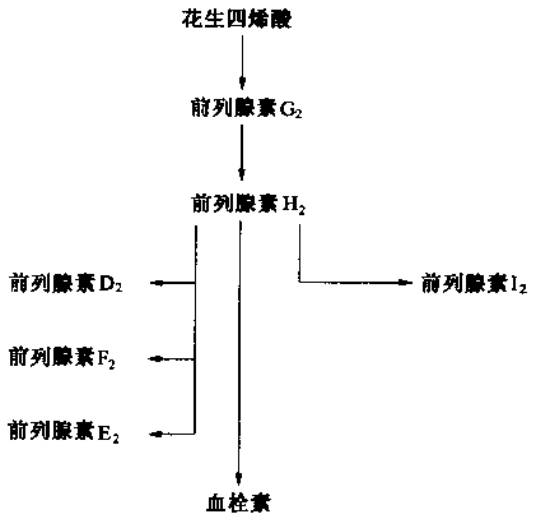
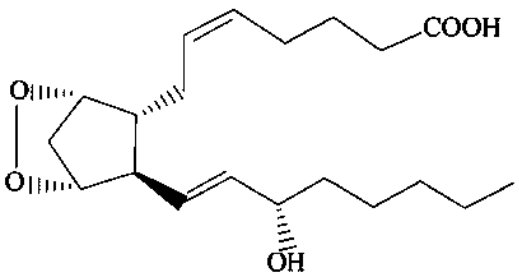


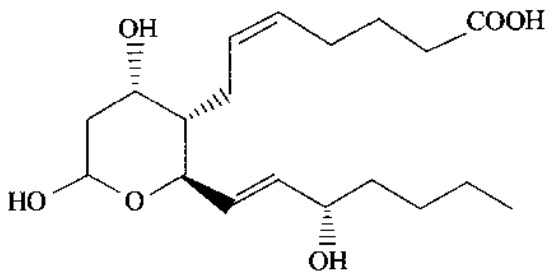
图 13－18

问题：前列腺素 H_2 区别于血栓素的结构特性是什么？

前列腺素 H_2（PGH_2）是内过氧化物，氧原子与环戊烷的环相连接：



而血素烷结构中，氧原子是编入环戊烷环内的，形成了六圆环：



血栓素是首先是从血小板中提取分离出来的，可引起与血凝相关的血小板的聚集。

白三稀

另一组与前列腺素有化学相关性的化合物是白三烯。这些化合物也是由花生四烯酸衍生而来的，是于白细胞中发现的线性的氧化产物。白三烯的特征是有共轭三烯双键。图 13－19 列出了由花生四烯酸到白三烯的转化过程。

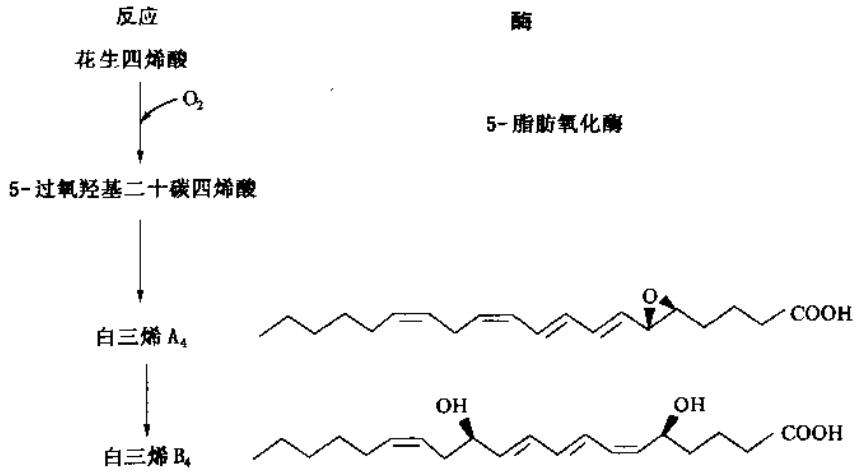


图 13－19　花生四烯酸转化为白三烯.

白三烯 B_4 是哺乳动物组织中与炎症反应相关的最有效的趋化剂之一；1.0nmolL^{-1}的浓度即可引起嗜中性粒细胞向损伤部位或感染部位的移动。

13.10　胆固醇的代谢

胆固醇的生物学功能

胆固醇与两类主要的生物过程相关。一是胆固醇是细胞膜的结构组分；二是它是一些物质的母体化合物，类固醇激素、维生素 D_3（胆钙化甾醇）及胆盐都是由胆固醇衍生而来。胆固醇可在肝细胞和肠道上皮细胞内重头合成，也可由饮食脂衍生而来。胆固醇的重头合成是受饮食脂中胆固醇与甘油三酯量的调节的。

肝脏及肠道上皮细胞内胆固醇的生物合成

胆固醇的生物合成是由乙酰－CoA 开始的，是一个非常复杂的过程，需要 32 种不同的

酶催化，部分酶存在于胞液中，另一部分则在内质网膜上。胆固醇的基本碳骨架是异戊二烯（见第6章）。

图13－20列出了胆固醇生物合成过程中的关键中间物。

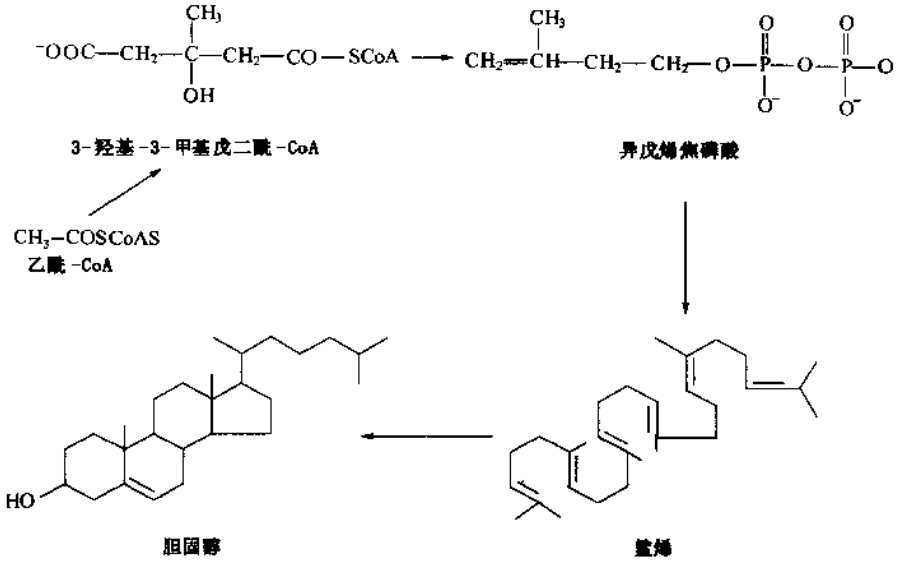


图13－20　胆固醇的生物合成

胆固醇生物合成途径的起始反应是，在肝细胞液中硫解酶和HMG-CoA合酶的作用下，由乙酰－CoA生成3－羟基－3－甲基戊二酰－CoA（HMG-CoA）。

例13.14

由硫解酶和HMG-CoA合成酶催化的反应如下：

（a）硫解酶

$$2CH_3COSCoA \rightarrow CH_3COCH_2COSCoA + CoASH$$

乙酰－CoA　　乙酰乙酰－CoA

（b）HMG-CoA合酶

$$H_2O + CH_3COCH_2COSCoA + CH_3COSCoA \longrightarrow$$

乙酰乙酰－CoA　　乙酰－CoA

$$^{-}OOC\ CH_2C(CH_3)(OH)CH_2COSCoA + H^{+} + CoASH$$

3－羟基－3－甲基戊二酰－CoA

问题：利用何种生化方法将3－羟基－3－甲基戊二酰－CoA还原为异戊二烯化合物，异戊烯焦磷酸？

在3－羟基－3－甲基戊二酰－CoA还原酶催化的反应中NADPH是电子的供体；随后进行两个有ATP和两种特异性激酶参与的磷酸化反应，及一个ATP－依赖的脱羧反应。例13.15与图13－21概述了反应过程。

例13.15

异戊烯焦磷酸的生成过程如图13－21所示。

经异构酶的作用，部分异戊烯焦磷酸可转化为其异构体二甲基烯丙基焦磷酸，因而产生了混合物，异戊烯焦磷酸 二甲基烯丙基焦磷酸。从这一步骤开始，二甲基烯丙基焦磷酸的碳链长度逐渐增加；而后被还原成鲨烯，鲨烯的折叠链中包含 30 个碳原子，不包含氧原子（见第 6 章）。异戊烯焦磷酸转化为鲨烯的过程如图 13－22 所示。

胆固醇生物合成的最后一步需要氧分子的参与，鲨烯链环化产生初级类固醇羊毛甾醇，随后被修饰为胆固醇。鲨烯的环化过程如图 13－23 所示。

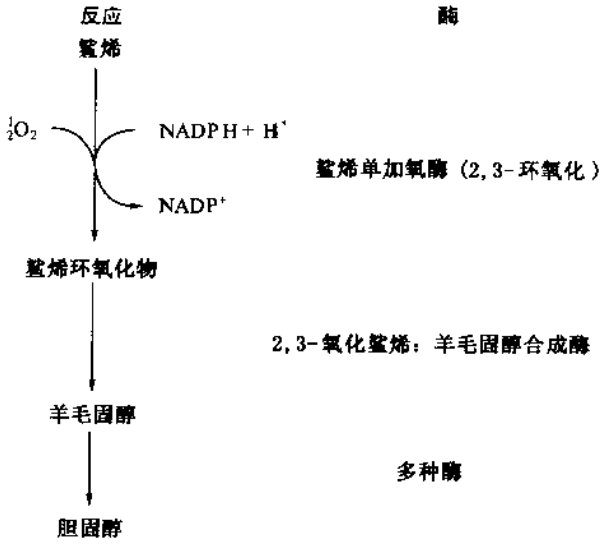


图 13－23　由鲨烯合成胆固醇

问题：胆固醇的生物合成是如何受饮食中胆固醇量的调节的？

是反馈机制的作用，细胞内的游离胆固醇可抑制 HMG-CoA 还原酶。饮食中富含胆固醇时，肝细胞内胆固醇量增加，胆固醇的生物合成受抑制。相反，低胆固醇高甘油三酯饮食可刺激胆固醇的生物合成。

胆固醇的代谢包括烷基侧链的修饰与非环上取代基的引入。在催化肝内胆盐及肾上腺与生殖腺内类固醇激素的生成过程中，一组酶，单加氧酶起着重要的作用。

胆固醇合成的调控

通过与 LDL 受体的结合而进入细胞的胆固醇酯被水解产生胆固醇与一个脂酰基链。随后，胆固醇激活了可使胆固醇再酯化的酰基－CoA 胆固醇酰基转移酶（ACAT）。无效循环中，胆固醇酯又可被胆固醇酯水解酶所水解。胆固醇有多条去路：可离开细胞与受体如高密度脂蛋白（HDL）结合，也可被转化为类固醇激素，或由 ACAT 催化而再酯化。细胞内胆固醇浓度降低后，HMG-CoA 还原酶活性升高，LDL 受体数目也增多，即由于重头合成与对循环中富含胆固醇的脂蛋白的吸收两方面的因素，导致细胞内胆固醇量的增多。胞内胆固醇量的增多又会迅速降低 HMG-CoA 还原酶与 LDL 受体二者的 mRNA 水平。此协同调节作用是由于编码这两个蛋白的基因上一段 8 个核苷酸序列而引起的；这段序列被称为固醇调节因子－1。

胆盐

饮食中的脂类仅在有足量的胆盐存在时才可被消化吸收，胆盐是由肝脏合成的，经胆管

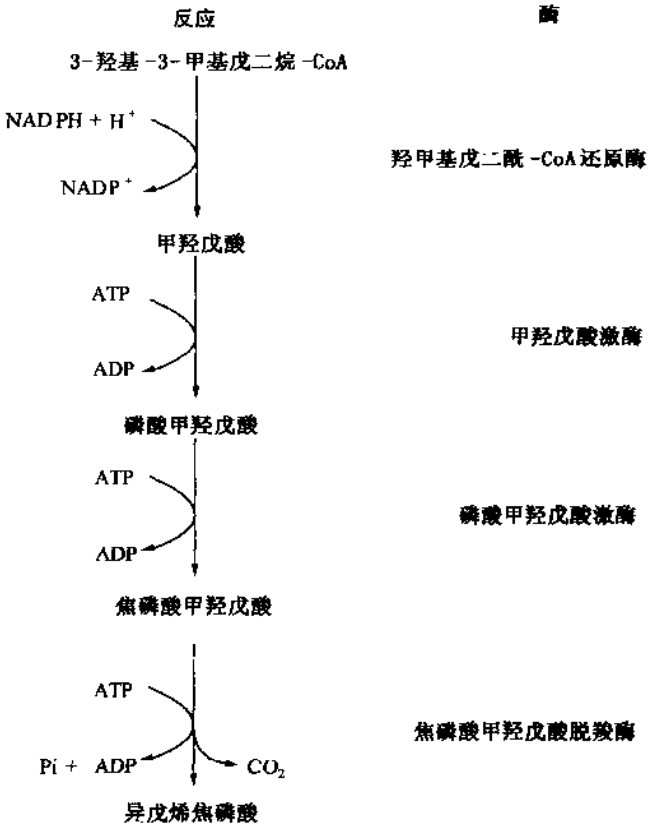


图 13-21　异戊烯焦磷酸的生成

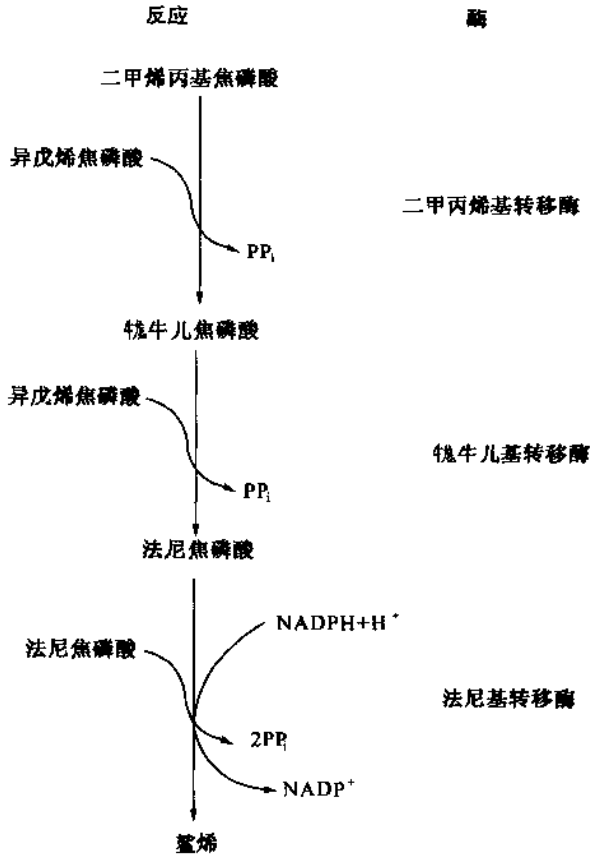


图 13-22　鲨烯的生成

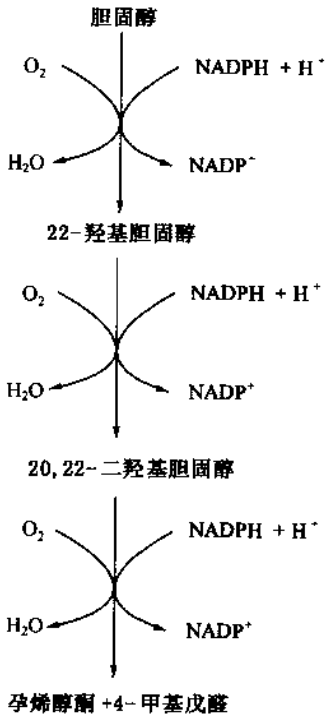


图 13－25　孕烯醇酮的合成

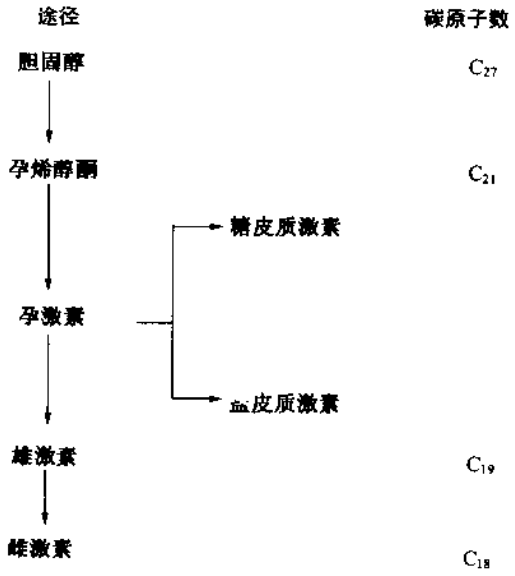


图 13－26　胆固醇与类固醇激素之间的相互关系

脂肪组织中释出的脂肪酸增多，同时肝内生酮作用的速度也提高。饥饿 1～24 天期间，血液中酮体的浓度可增加到 8mmolL^{-1}。脑可利用酮体作为燃料；脑所需能量的 70% 由酮体供应，其余的则由葡萄糖供给。因一些组织利用酮体而使整个机体对葡萄糖的利用减少（图 13－27）。长时间饥饿期间（>24 天），3－羟基丁酸对脂肪组织中脂肪酸的释出有调节作用，可能是通过增加组织对胰岛素的敏感性而起到调节作用的。

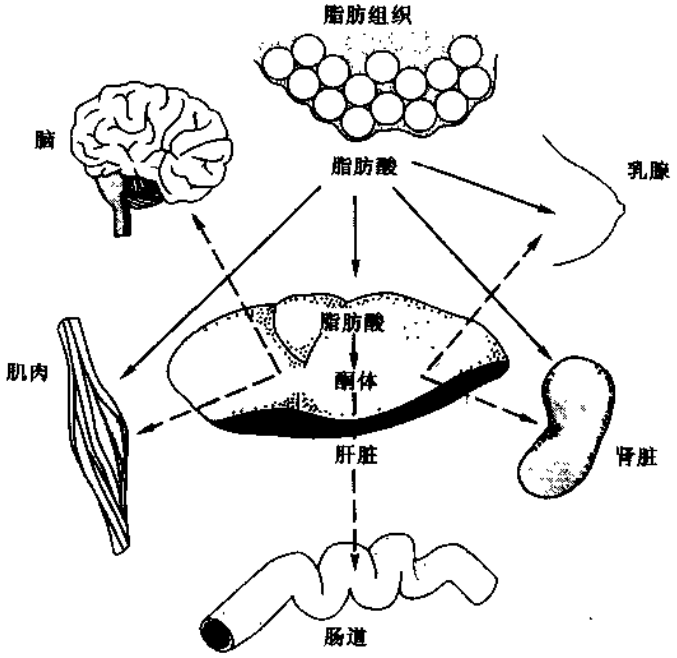


图 13－27　饥饿时酮体的利用

分泌入十二指肠，再进入空肠。胆盐微团在回肠中被再吸收，大部分经血液返回肝脏。肝脏分泌的胆盐可经胆管进入并贮存在胆囊；分泌的（过剩的）胆固醇被胆盐微团所分解。总之，与回肠脂质吸收相关的胆盐中，有 90% 经过肠肝循环而被再利用，10% 经粪便排出。胆盐丢失量的补充必需由胆固醇转化而来。因此，重新合成胆固醇本身对保持胆盐的供给起着重要作用。

胆固醇转化为胆盐的过程是，在胆固醇 7－α－羟化酶的作用下，羟基基团被引入胆固醇菲环上，随之进行侧链的修饰。产生胆酸与鹅脱氧胆酸，如图13－24所示。

胆酸合成的限速步骤是胆固醇 7－α－羟化酶催化的反应。此酶活性的变化是胆固醇 7－α－羟化酶 mRNA 水平改变的结果。

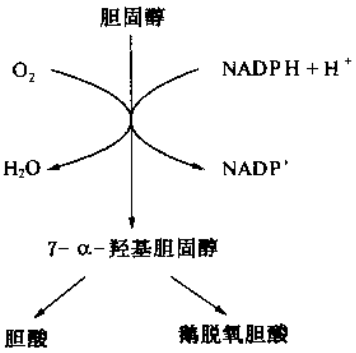
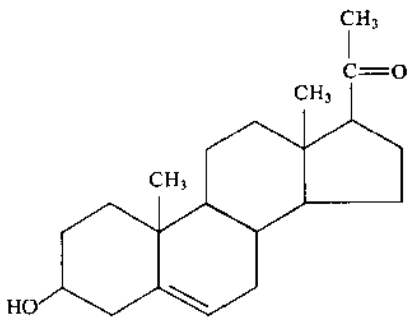


图 13－24　胆酸与鹅脱氧胆酸的生成

问题：为什么单加氧酶催化的反应需要 NADPH 作为共底物？

单加氧酶仅催化氧分子内两个氧原子中的一个于底物中形成羟基或酮基。另一个氧原子则与氢产生水。反应中底物和 NADPH 分别是质子与电子的供体。单加氧酶催化的反应在内质网膜上进行，有铁-硫蛋白、铁氧还蛋白及细胞色素 P_{450}的参与。



孕烯醇酮

类固醇激素

所有类固醇激素的合成都是由胆固醇转化为孕烯醇酮而开始的。转化途径如图13－25所示。胆固醇的侧链经三次有效的单加氧酶反应所切断，并于切断位置引入酮基。

随后孕烯醇酮分子结构的变化产生了其他的类固醇激素。所有变化都是单加氧酶催化的，包括：于甾醇菲环的特异位置上以羟基或酮基的形式引入氧原子，及侧链的后去除（图 13－26）。

13.11　脂类代谢的调控

脂肪组织中脂肪酸的释出受甘油三酯水解速率及脂酰－CoA 与 3－磷酸甘油酯化速率的影响。水解速率受激素调节，激素与细胞表面受体结合并刺激腺苷酸环化酶（此酶催化 ATP 产生 cAMP）活性。激素敏感性脂肪酶（见 13.4）以两种形式存在，一种是极低活性的，另一种是被磷酸化的高活性的。在受到腺苷酸环化酶的激素刺激之前，脂肪细胞内低活性脂肪酶占优势。腺苷酸环化酶浓度增加激活蛋白激酶，活化的蛋白激酶引起了低活性脂肪酶的磷酸化。因此，甘油三酯水解速度加快，随即脂肪酸由脂肪细胞中释出。故，一些组织如心脏、骨骼肌与肝脏能很好地利用脂肪酸。

肝脏内，β－氧化与脂酰－CoA 的再酯化都可能进行。β－氧化速度是由脂酰基团进入线粒体基质的速率决定的，其进入速度被丙二酸单酰－CoA 所降低，因为丙二酸单酰－CoA 可抑制肉碱软脂酰转移酶（此酶能够帮助脂酰基团进入线粒体基质）。在脂肪生成的过程中，胞液内丙二酸单酰－CoA 的浓度足够抑制转移酶的活性以保持脂肪酸的酯化作用。饥饿时，由

脱氢酶转化为2-反,4-顺-二烯酰-CoA。后者再经一轮β-氧化而被进一步代谢，并需第二个辅酶，在线粒体内活性较高的2,4-二烯酰-CoA还原酶。最终，亚油酸的氧化产生了9分子的乙酰-CoA。

由脂肪酸产生的乙酰-CoA的去路：生酮作用

13.4　何种因素决定血液中乙酰乙酸与3-羟基丁酸的相对浓度?

答：

在NAD-依赖的脱氢酶的催化下，乙酰乙酸被转化为3-羟基丁酸。此反应是可逆的，反应平衡常数接近于1。

$$K_e=\frac{[\text{3-羟基丁酸}][NAD^+]}{[\text{乙酰乙酸}][NADH][H^+]}\simeq 1$$

13.5　与乙酰乙酸相比，3-羟基丁酸是高能燃料。在心肌与骨骼肌中其能量是如何释放出的?

答：

3-羟基丁酸被激活成为3-羟丁酰-CoA，而后经β-氧化途径中的3-羟丁酰-CoA脱氢酶化为乙酰-CoA，乙酰-CoA在柠檬酸循环中氧化产能。

脂肪的生成

13.6　由乙酰-CoA合成1分子软脂酸需要将多少葡萄糖转化为5-磷酸核酮糖?

答：

葡萄糖被转化为5-磷酸核酮糖时，戊糖磷酸途径氧化部分的氧化还原反应中会产生NADPH。进入途径中的每分子葡萄糖可还原2分子$NADP^+$。部分NADPH将被用于软脂酸的合成。可按下列步骤计算葡萄糖的量：

1. 要合成1分子的软脂酸，脂肪酸合成酶上会发生7轮反应。
2. 合成酶上进行的每一轮过程都是两个利用NADPH为电子供体的还原反应。因此，合成1分子软脂酸需要14分子NADPH。
3. 8个乙酰基团要由线粒体内转至胞液中，以提供合成1分子软脂酸所需的碳原子。在乙酰基团的转移过程中，8分子的苹果酸被氧化脱羧为8分子丙酮酸与8分子二氧化碳，同时8分子$NADP^+$被还原。因此，所需要的14分子NADPH中的8个在乙酰基团的转移过程中又将被利用；剩余的6分子NADPH将由3分子葡萄糖经戊糖磷酸途径供给。

13.7　*Escherichia coli* 中脂肪酸合成酶区别于哺乳动物多酶复合体的特性是什么?

答：

定位于哺乳动物脂肪酸合成酶单一多肽链上的每一个酶在*E. coli*中都是独立的蛋白。*E. coli*的脂酰载体蛋白（ACP）$M_r=8\,847$，含4-磷酸泛酰巯基乙胺。脱水酶的相对分子质量为28 000，催化软脂酸合成中羟酸中间体的反2-3或顺3-4的脱水反应。羟基脂肪酸链长为C_{10}时，软脂酸的合成可由下式进行：

$$\underset{\text{3-羟基癸烯酰-ACP}}{CH_3(CH_2)_6CHOHCH_2COACP}\rightarrow \underset{\Delta^3\text{-癸烯酰-ACP}}{CH_3(CH_2)_5CH{=}CHCH_2COACP}$$

再经3次合成酶的作用即可加长Δ^3-癸烯酰-ACP产生

$$\underset{\text{软脂酸}}{CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH}$$

13.8　(a) 何种酶促反应可将哺乳动物组织中饱和脂肪酸转化为其单不饱和衍生物，(b) 此反应在细胞的什么部位发生?

答：

胰岛素是抗脂解的激素，对脂肪组织的作用是增进葡萄糖向脂肪细胞的运送，刺激脂生成，抑制脂降解。因此，丙酮酸脱氢酶与乙酰-CoA羧化酶被激活，而激素敏感性脂肪酶被抑制。正常情况下，饱食时胰岛素刺激脂肪的沉积。

胰岛素对肝内胆固醇的合成也有刺激功效。肝组织中HMG-CoA还原酶被激活。HMG-CoA还原酶，与激素敏感性脂肪酶相似，也有两种存在形式；一种是磷酸化的（无活性），另一种是去磷酸化的（有活性）。此酶的磷酸化依赖于胞内cAMP浓度的增加与蛋白激酶的活化作用。而此酶的去磷酸化（活化）则是由磷酸酶所催化的。脂肪细胞内，另一相似的磷酸酶使激素敏感性脂肪酶去磷酸化（失活）。胰岛素可刺激肝细胞与脂肪细胞内磷酸酶的活性。因此，活化的HMG-CoA还原酶在肝细胞中占优势，使HMG-CoA能参与胆固醇的合成，而脂肪细胞中激素敏感性脂肪酶无活性。

问题解答

脂类的消化

13.1 小肠内因细菌而引起的胆盐的异常早期解离的后果是什么?

答：

小肠肠腔内容物的pH在6.0～8.0之间。肠腔内的胆盐是离子化的；如，原于牛磺酸与胆酸盐的结合，牛磺胆酸的$pK_a \approx 1.5$；由于甘氨酸与胆酸盐的结合，甘氨胆酸的$pK_a \approx 3.7$。而胆盐的早期解离会释出游离的胆酸盐，其$pK_a = 5.0$。与可溶的胆盐相比，胆酸盐的高pK_a值使其在肠腔的水溶性环境中的溶解性降低。因此，肠腔内胆盐的再吸收减少，分泌出胆汁酸。

脂肪酸的氧化

13.2 由1 mol软脂酰-CoA的β-氧化可获取多少ATP?

答：

1 mol软脂酰-CoA经β-氧化产生8 mol乙酰-CoA。总反应式为：

软脂酰-CoA + 7FAD + 7NAD^+ + 7CoA + 7H_2O→8 乙酰-CoA + 7$FADH_2$ + 7NADH + 7H^+

$FADH_2$和NADH + H^+在线粒体的电子传递集群中被氧化：

$$7FADH_2 + 7NADH + 7H^+ + 7O_2 \rightarrow 7FAD + 7NAD^+ + 14H_2O$$

电子传递过程与ATP的合成相偶联，每摩尔$FADH_2$被氧化生成2 mol ATP；因而7 mol $FADH_2$产生14 mol ATP。而每摩尔的NADH被氧化生成3 molATP；则7 mol NADH生成21 mol ATP。故，共生成35 mol ATP。

13.3 亚油酸完全氧化的结果是什么?

答：

18碳的脂进行β-氧化，缩短为十二碳二烯酸$C_{12:2}$ Δ3，6，会有3分子的乙酰-CoA生成：

$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COO^- \rightarrow$$
$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2COO^- + 3CH_3COSCoA$$

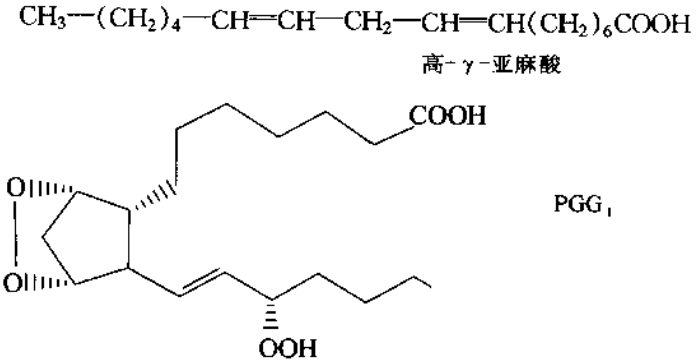
在下一轮的β-氧化进行之前，经Δ^3-顺-Δ^2-反-烯酰-CoA异构酶的作用，顺式Δ^3双键被转化为反式Δ^2双键：

$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CH\ CH_2CH{=}CHCH_2COO^- \rightarrow$$
（顺）
$$CH_3(CH_2)_4CH{=}CH(CH_2)_2CH{=}CHCOO^-$$
（反）

下一轮的β-氧化完毕后，生成了4-顺-烯酰-CoA中间体。此中间体可被烯酰-CoA

环加氧酶活性的抑制阻断了前列腺素的合成，进而减缓了组织中的炎症反应。

13.13　与花生四烯酸相似，同源γ-亚麻酸也是前列腺素的前体化合物。那么，由同源γ-亚麻酸衍生而来的化合物是如何命名的？



答：

高γ-亚麻酸碳5位上虽没有双键，但碳13位上有一个双键，PGG_1的所有衍生物，即高γ-亚麻酸系列的初级前列腺素，都被命名为PG，后续一个A-I的字母及表示分子中单一双键的数字1。

胆固醇及其相关化合物

13.14　胆钙化醇（维生素D_3）是由胆固醇衍生的。是在什么组织内如何衍生而成的？

答：

经自然的太阳光照射，皮肤内7-脱氢胆固醇即可转化为胆钙化醇。

13.15　胆钙化醇可代谢产生类固醇激素。这一过程是在什么组织内如何进行的？

答：

胆钙化醇碳骨架1，24和25三个位置被羟基化。肝脏内，胆钙化醇被羟基化生成25-羟基胆钙化醇。随后的羟基化反应则在肾脏中进行，产生了三个新的代谢物，分别是1,25-二羟基胆钙化醇，24,25-二羟基胆钙化醇，和1,24,25-三羟基胆钙化醇。1,25-二羟基-及1,24,25-三羟基胆钙化醇都是与肠腔内钙吸收相关的活性激素。

脂类代谢的调控

13.16　如何消耗ATP以保持肝脏HMG-CoA还原酶的无活性形式？（提示：调节体系与糖原磷酸化酶的相似，见11.9）。

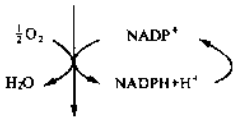
答：

参见图13-28。在共同调节酶蛋白的磷酸化反应中，ATP是共底物。两个磷酸化反应都与HMG-CoA还原酶的调节相关：

1. 在HMG-CoA还原酶激酶催化的反应中，HMG-CoA还原酶被磷酸化。
2. cAMP依赖的蛋白激酶又将HMG-CoA还原酶激酶磷酸化，使其转化为活性形式。而后，HMG-CoA还原酶与HMG-CoA还原酶激酶的去磷酸化都将释出无机磷酸。每一HMG-CoA还原酶分子的磷酸化消耗1分子ATP。同样，最初HMG-CoA还原酶激酶的磷酸化也要利用1分子ATP。然而，1分子活化的HMG-CoA还原酶激酶却可以催化个HMG-CoA还原酶分子的磷酸化。

(a) 由脂酰-CoA 去饱和酶与细胞色素 b_5 组成的酶复合体催化烷稀链的氧化，反应如下：

$$CH_3—(CH_2)_n—CH_2—CH_2—(CH_2)_n—COOH$$



$$CH_3—(CH_2)_n—CH=CH—(CH_2)_n—COOH$$

(b) 此电子传递链定位于内质网中。

磷脂及鞘脂类的合成

13.9　为何人类与实验动物膳食中胆碱的缺乏会导致脂肪肝，即肝细胞内有大量的脂肪滴？

答：

磷脂酰胆碱的重头合成需要胆碱的参与。肝脏内磷脂酰胆碱被合成后，进入膜及脂蛋白中。磷脂酰胆碱的重头合成也需要1,2-二脂酰甘油的参与。若不能获取足够的胆碱，磷脂酰胆碱的重头合成途径即不能进行。则1,2-二脂酰甘油被转化为三脂酰甘油，因三脂酰甘油不能被肝脏分泌入脂蛋白中而蓄积。故，肝细胞内充满甘油三酯。

13.10　若已知乙醇可刺激磷脂酸磷酸酶的活性，那么长期饮酒是如何导致脂肪肝的发展的？

答：

由乙醇而激活的磷脂酸磷酸酶可刺激二酰甘油的合成，进而刺激甘油三酯的合成。因此，肝细胞内甘油三酰浓度增加。

13.11　阿什凯纳兹犹太儿童，每 900 人中有 1 人患有 Tay-Sachs 病，一种脂质存积疾病，导致神经节苷脂神经酰胺-β-葡萄糖-β-半乳糖-*N*-乙酰半乳糖胺*N*-乙酰神经氨酸在脑内蓄积。为何会发生此疾病？

答：

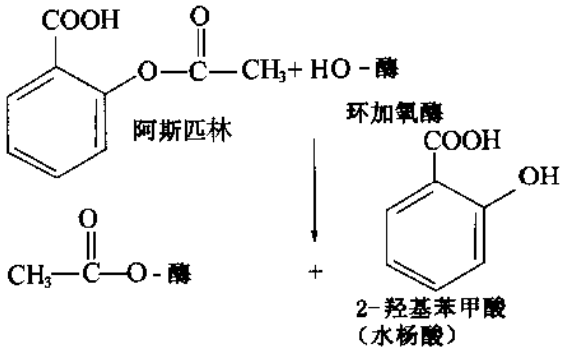
因脑细胞溶酶体内缺少由 A 和 B 两个亚基组成的氨基己糖苷酶 A。此酶的缺乏使神经节苷脂上末端 *N*-乙酰半乳糖胺的水解不能进行，以致要在溶酶体内被转换的膜磷脂积聚（图 13-16）。

前列腺素

13.12　阿司匹林药物消炎作用的生化机制是什么？

答：

前列腺素如 PGE_2 是有效的血管舒张剂，可增进血液的流动。炎症部位会有局部的血管舒张。阿斯匹林能不可逆地抑制环加氧酶的活性。酶结构中一个丝氨酸残基被乙酰化：



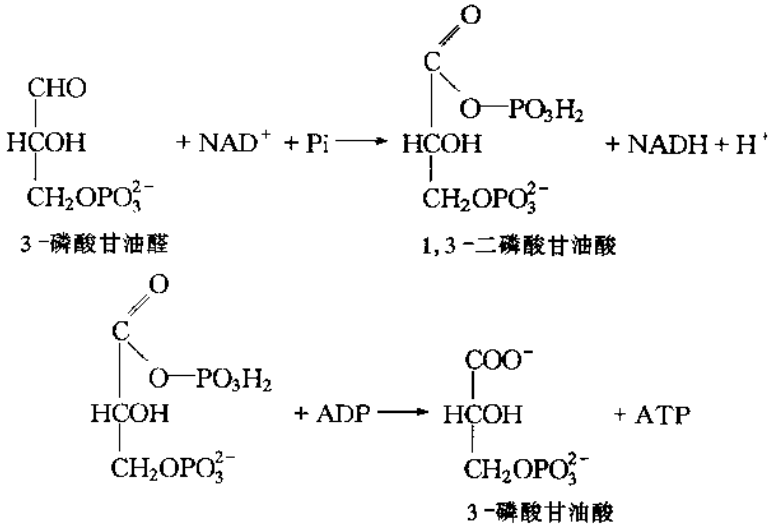
第14章 氧化磷酸化作用

14.1 导言

生物能学的研究包含：①由碳水化合物（见11章）和脂类（见13章）氧化而产生的还原型烟酰胺与黄素核苷酸，经线粒体电子传递链最终被氧化的过程；②氧化过程与ATP合成相偶联的机制。此ATP合成方式被定义为氧化磷酸化作用，不同于以可溶性酶催化的ADP的磷酸化作用。后者需要以磷酸衍生物为底物，因而被称为底物水平的磷酸化作用（见第11章）。

例 14.1

糖酵解中，在3-磷酸甘油醛被氧化为3-磷酸甘油酸的过程中，ADP被磷酸化为ATP。被磷酸化的中间体是1,3-二磷酸甘油酸，它接受氧化作用产生的能量的。



这是底物水平磷酸化作用的一个实例。

氧化磷酸化是所有高级生命体代谢的中心，因为由此而产生的ATP水解自由能被用于，特别是核酸（第7和16章）、蛋白质（第4、9和17章）与复合脂类（第6章）的合成，也被用于其他各种过程中，如肌肉收缩（第5章）及神经冲动传递的过程。

14.2 电子传递链的成分

线粒体中电子传递链，或称呼吸链，是中间代谢的还原载电子体将电子携带给氧和质于而产生水的手段。电子传递链的主要组成部分如下。

NAD^+/NADH

NAD^+/NADH的共轭氧化还原对的电子传递反应是：

$$NAD^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH \qquad E_0' = -0.32V$$

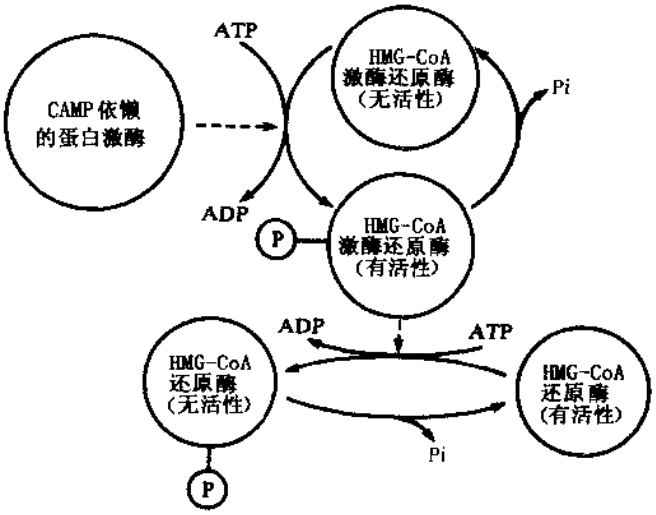


图 13－28

补充问题

13.17　膳食甘油三酯刺激胆固醇合成的机制是什么？

13.18　为什么给予脂肪肝患者起甲基基团供体作用的化合物即可减轻病情？

13.19　软脂酸完全氧化为二氧化碳和水可产生多少 ATP？

13.20　（a）1 mol 乙酰乙酸，（b）1 mol 3－羟基丁酸的氧化可生成多少 ATP？

13.21　摄食后胆盐微团的内容物是什么：（a）1，3－二软脂酰－2－亚油酰甘油，（b）1－硬脂酰－2－花生四烯酰磷脂酰胆碱？

13.22　由乙酰－CoA 合成 1 分子胆固醇需要利用多少葡萄糖来产生 NADPH？

13.23　油酸是如何转化为乙酰－CoA 的？

13.24　脂肪组织是如何获取 3－磷酸甘油以合成三酰甘油的？

13.25　乙酰－CoA 羧化酶的哪些特性使其在脂肪酸合成中起调节作用的？

13.26　氨基酸是如何充当软脂酸合成的前体化合物的？

13.27　哪些酶与油酸被氧化为乙酰－CoA 的过程相关？

13.28　解释哺乳动物脂肪组织中脂肪库是如何成为细胞内水的来源的？

13.29　骨骼肌中肉碱软脂酰转移酶的缺乏对人的长时间运动能力有何影响？

13.30　阿斯匹林对防止血小板的聚集作用有效吗？

13.31　如果可能为某个人提供不含胆固醇与甘油三酯的饮食的话，那么这将对脂肪组织中三酰甘油的沉积有何影响？

13.32　3－羟基－3－甲基戊二酰－CoA 是肝脏内乙酰乙酸与胆固醇合成过程中的中间体。此化合物是如何有效利用于上述生物合成途径的？

13.33　胆固醇酯是如何合成的？

13.34　长时间的饥饿为何会使血液中酮体浓度升高？

13.35　脂肪酸与脂蛋白结合才可被转运的物理-化学原由是什么？

13.36　花生四烯酸是由哪类细胞释出而进入胞液的？

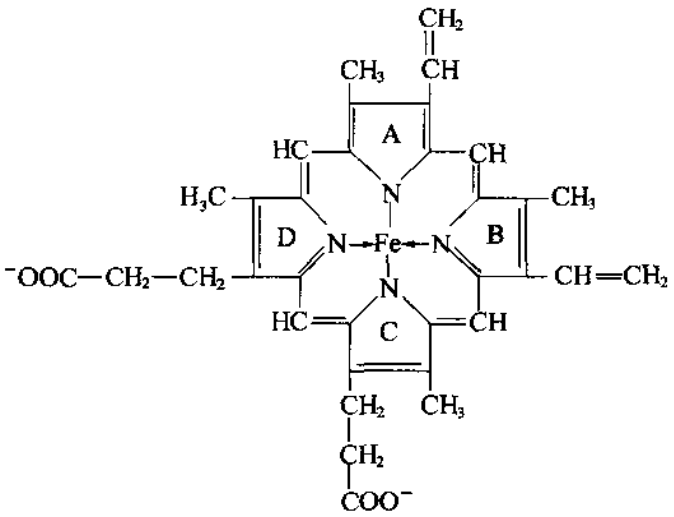
生一个中间体，即半还原的自由基形式（半醌），简写成 CoQH。

细胞色素

细胞色素（来自于希腊语："细胞颜色"）是一组含血红素辅基的蛋白质（见第 5 和 15 章）。线粒体内包含三类细胞色素：a、b 和 c，带有不同结构的血红素。

例 14.4

血红素环的环四吡咯结构通式如下：



细胞色素 c 和 c_1 中，血红素环通过硫醚键与蛋白质共价连接，硫醚键是经吡咯环 A、B 上的乙烯基（ —CH═CH_2 ）与蛋白质半胱氨酸残基反应而形成的。细胞色素 b 中无硫醚键。细胞色素 a 和 a_3 中，A 环上的乙烯基团被一个碳氢链所取代，D 环上的甲基被甲酰基（ —CHO ）取代。除了血红素以外，细胞色素 a 和 a_3 还包含束缚铜离子。

问题：如何检测细胞色素介导的电子传递？

细胞色素中的电子传递是 Fe^{2+} 与细胞色素 a 和 a_3 中 Cu^{+} 之间的直接电子转移。金属离子氧化态的变化导致了细胞色素的可见吸收光谱的变化；用分光光度法测定这些变化即可定量电流。

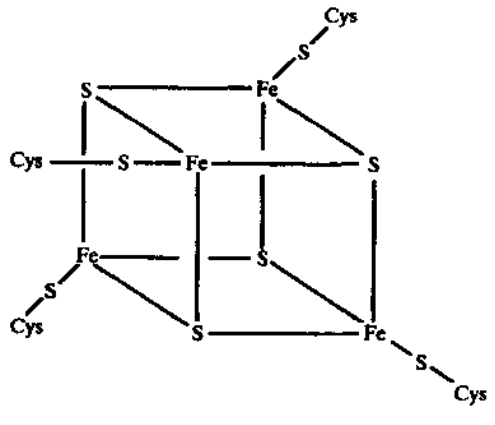


图 14－1　一个 4－Fe 铁硫集合

铁-硫蛋白

电子传递链包含一系列的铁硫蛋白（亦称非血红素铁蛋白）。铁原子通过半胱氨酸的 —S— 基和硫离子而连接到蛋白质上；每一 4－Fe集合如图 14－1 所示。这些蛋白质通过直接的电子转移方式介导电子的传递；铁硫蛋白中铁氧化态的变化可由电子自旋共振波谱监测（ESR）。

14.3　电子传递链的构成

子传递链是由列于表 14.1 中的四个复合物组成的。这些化合物中电子转移的方式如图 14－2 所示。

其中，E_0'是标准氧化还原电位（见第 10 章）。实际上，电子是以氢阴离子（H^-）传递的，氢阴离子在形式上与（$H^+ + 2e^-$）相当。

问题：如何测出 NAD^+/NADH 的电子传递？

NADH 于 340nm 波长处有最大特征吸收光谱，而 NAD^+ 却没有。因此，可用分光光度计测定 340nm 波长处样品吸收值的变化，以监测 NAD^+/NADH 中的电子传递。

例 14.2

NADH 在线粒体内经电子传递链被氧化。而核苷酸不能透过线粒体内膜。那么，在胞液内产生的 NADH（如糖酵解产生的）是如何参与电子传递链中电子传递的？

细胞质中的 NADH 还原当量是通过穿梭机制，如图 11－19（333 页）所示的有天冬氨酸和苹果酸参与的穿梭机制，被转运入线粒体的。此穿梭机制的净效果是将 NADH 转运入线粒体。

黄素核苷酸

FAD 和 FMN（黄素单核苷酸）的电子传递反应是：

$$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2$$

$$FMN + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FMNH_2$$

电子以 H 原子形式被这类核苷酸所传递［H＝（$H^+ + e^-$）］。

这些载体是独自将电子转入电子传递链的，与 NAD^+/NADH 共轭对无关。胞浆还原当量的主要穿梭机制是图 11－20 所示的 3－磷酸甘油穿梭机制。

例 14.3

电子从琥珀酸、3－磷酸甘油及黄素依赖的脂肪酸氧化步骤进入电子传递链的方式如下：

(a) 琥珀酸 + FAD → 延胡索酸 + $FADH_2$

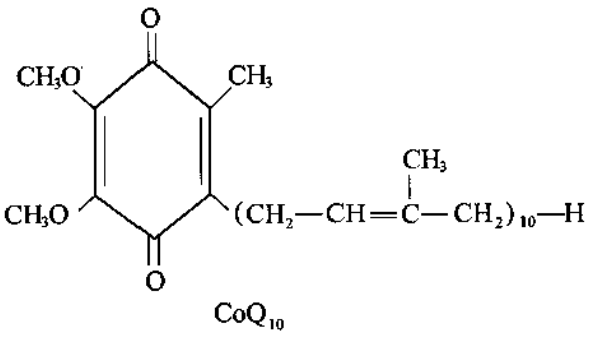
(b) 3－磷酸甘油 + FAD → 磷酸二羟丙酮 + $FADH_2$

(c) 乙酰－CoA + FAD →反－Δ^2－烯酰－CoA + $FADH_2$

与 NAD^+/NADH 共轭对有所不同，黄素辅酶并非是游离的，而是与其相应底物的脱氢酶共价连接。这些酶是膜被的，与线粒体内膜上的呼吸链密切相关。

辅酶 Q

辅酶 Q（亦称泛醌或 CoQ）是苯醌衍生物，带有由异戊二烯重复单位组成的长的碳氢侧链。一般可根据重复单位的数目将辅酶 Q 分类。哺乳动物细胞的线粒体中辅酶 Q 包含 10 个异戊二烯重复单位，因此，简写成 CoQ_{10}。



CoQ_{10}

此分子经历（$2H^+ + 2e^-$）还原反应成为 $CoQH_2$（或称泛醌醇）。还原反应分两步进行，产

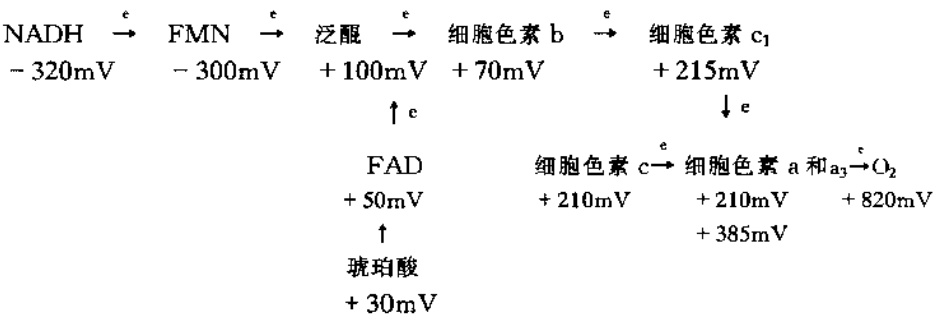
或 NADH）而改变，那么，E 值与氧化及还原型电子传递链被测组分之间的关系即可测出。E_0'值可由能斯特方程式（见第 10 章）而计算出：

$$E = E_0' - \frac{RT}{nF}\ln\frac{[A_{还原}]}{[A_{氧化}]} \tag{14.1}$$

其中，$[A_{还原}]$ 与 $[A_{氧化}]$ 分别表示还原型和氧化型电子传递链组分 A 的浓度；是线粒体制备液经分光光度法测定而得出的。

例 14.6

根据氧化还原电位滴定，线粒体电子传递链各组分的 E_0' 值被测出，如下所示：



电位滴定技术还可指明①电子传递链的某一组分是 $1e^-$ 载体还是 $2e^-$ 载体，由 E 对 $\ln\frac{[A_{还原}]}{[A_{氧化}]}$ 做一曲线，根据曲线的斜率即可判定；②某组分是否为（$H^+ + e^-$）的载体，若是则 E_0' 值是 pH 依赖的。

14.4　电子传递与 ATP 合成的偶联

电子传递与 ATP 合成的偶联是因质子电化学-电位梯度的作用而引起的，这一理论已被广泛接受，质子电化学-电位梯度由符号 $\Delta\mu_{H^+}$ 表示。此梯度的产生是电子传递的结果，并在 ATP 合成酶催化 ADP 与 Pi 生成 ATP 的过程中消失。

问题：$\Delta\mu_{H^+}$ 是如何经实验而确定的？

$\Delta\mu_{H^+}$ 可由下式确定

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\phi - \frac{2.3RT}{F}\Delta pH \tag{14.2}$$

其中，$\Delta\psi$ 和 ΔpH 分别表示电位（以伏特为单位）与跨线粒体内膜产生的 pH 差；R、T、F 则分别为气体常数、绝对温度和法拉第常数。$\Delta\psi$ 和 ΔpH 值都可由实验测得。

例 14.7

对于一个可透过线粒体内膜的离子化的化合物，测定平衡状态时其在线粒体内外的浓度即可得出 $\Delta\psi$ 值，这是最常见的确定 $\Delta\psi$ 值的方法。$\Delta\psi$ 可根据能斯特方程（14.1）算出，对于带 $+n$ 个电荷的 X 离子可以下式表达：

$$\Delta\psi = \frac{RT}{nF}\ln\frac{[X^{n+}]_{外}}{[X^{n+}]_{内}} \tag{14.3}$$

也可由因 $\Delta\psi$（电色现象）引起的膜内组分光谱特性的变化而计算出；如 200mV 的 $\Delta\psi$ 值与 $\sim 3\times10^5\ Vcm^{-1}$ 的跨膜电场相对应，膜厚度为 6nm。

表 14.1　电子传递链的蛋白复合体

复合体	酶的功能 / 名称	功能成分
I	NADH/CoQ 氧化还原酶	FMN；Fe-S 集合
II	琥珀酸/CoQ 氧化还原酶（琥珀酸脱氢酶）	FAD；Fe-S 集合
III	CoQ-细胞色素 c 氧化还原酶	细胞色素 b，细胞色素 c_1；Fe-S 集合
IV	细胞色素 c 氧化酶	细胞色素 a 和 a_3

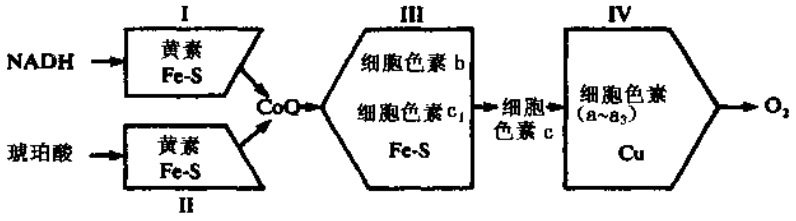


图 14－2　线粒体电子传递链的结构图

问题：用何种实验手段判定电子转移方式？

用了两种明显的实验方法：一种是特异抑制剂的效果实验，特异抑制剂能阻断电子流通过某一特定复合体；另一种是利用合成的氧化还原对运载电子至特定复合体上，当然这取决于复合体与氧化还原对的相对 E_0' 值。

例 14.5

一些常用的电子传递链抑制剂的作用部位如图 14－3 所示。这些位置是应用交换原理（见第 10 章）而确定的。例如，由真菌产生的抗生素-抗霉素 A 可引起还原型细胞色素 b 水平的提高，及还原型细胞色素 c_1 水平的下降（即氧化型细胞色素 c_1 的增多）；因此，导致抗霉素 A 与复合体 III 相互作用。

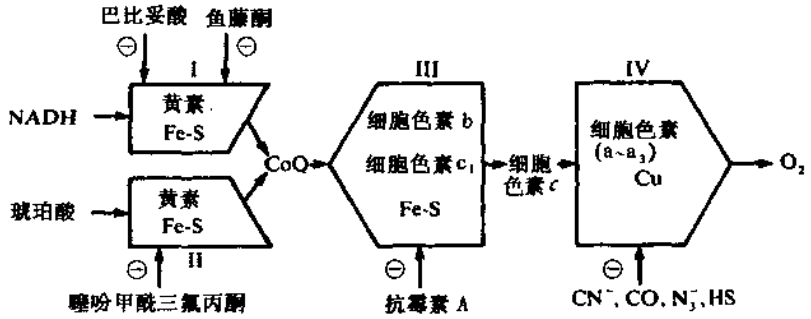


图 14－3　电子传递链抑制剂的作用部位

问题：电子传递链组分的 E_0' 值是如何测定的？

可利用氧化还原电位滴定技术来测定。实验中，将线粒体在无氧条件下培养，培养液中插入一个参比电极［如氢电极（见第 10 章）］和一个铂电极，还带有二级氧化还原介质。介质在培养液中形成氧化还原对，其 E_0' 值介于参比电极与电子传递链被测组分之间；以便电极与电子传递链被测组分之间能快速达到电子平衡。在某一特定的 E 值实验系统达到了平衡。此 E 值可通过加入还原剂（如还原型抗坏血酸

问题：缬氨霉素是如何使 K^+ 透过线粒体膜的？

缬氨霉素是一种抗生素，是流动的 K^+ 的载体，其结构内部富含极性氨基酸残基（可为 K^+ 提供结合位点），而外部则是疏水的缬氨酸残基。正是后者使内携 K^+ 的缬氨霉素扩散穿过膜，因而 K^+ 可透过膜。游离 K^+ 是不能以一定速度扩散入膜的。

14.6　质子传递机制的模型

环机制

20 世纪 60 年代初，Mitchell 提出了化学渗透模型，该模型中，从（$H^+ + e^-$）载体（如 $FMNH_2$）到一个电子载体（如铁硫蛋白）的电子转移导致了质子的转运，质子释出至线粒体内膜外。此过程之后，电子转移给从基质中吸取质子的（$H^+ + e^-$）载体。该模型中，电子传递链可组成三个环，如图 14－5 所示。

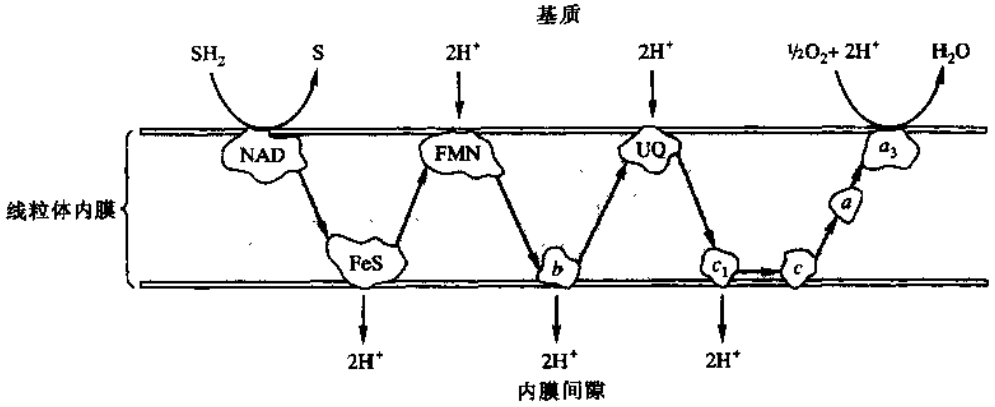


图 14－5　质子转移的 Mitchell 环机制。SH_2 = 还原底物，S = 氧化底物，FeS = 铁硫蛋白，a、a_3、b、c、c_1 = 细胞色素，UQ = 辅酶 Q（泛醌）

例 14.10

Mitchell 环机制可得出什么样的可经实验验证的推论？

此机制可得出两个实验可测的推论：

1．每一环中，每转运 2 个电子必定会有 2 H^+ 离子被转移。

2．电子传递链必须被组构成能交替给出（$H^+ + e^-$）载体和纯 e^- 载体的形式。

与推论（1）相关的实验依据在本部分的后面讨论，而与（2）相关的问题将在例 14.11 中概述。

质子泵机制

在这一机制中，通过电子传递链各组分进行的电子的传递导致了链蛋白结构的变化，如离子化的氨基酸残基的 pK_a 值发生了变化。例如，与基质侧的膜相连的某一残基 pK_a 值的增大将导致由基质中吸取质子，而与膜间隙侧的膜相连的某一残基 pK_a 值的减小将会引起质子的释出。这一过程的净效应便是质子由膜的基质侧向膜间隙侧转移。然而，质子泵并不造成较大的 H^+/e^- 化学计量值。

经复合物 I 传导的质子传递

复合物 I 介导电子由 $NADH+H^+$ 向辅酶 Q 转移。随后辅酶 Q 的还原与向量质子转运相偶联；测算出 H^+/e^- 化学计量（比例）为 1.0、1.5 和 2.0。

例 14.8

跨线粒体内膜产生的 ΔpH 也可由电中性的膜透弱酸（或弱碱）的平衡分配比例来计算。其逻辑推理如下。

对下列反应

$$H^+_{外} + A^-_{外} \overset{K_a}{\rightleftharpoons} HA_{外} \rightleftharpoons HA_{内} \overset{K_a}{\rightleftharpoons} H^+_{内} + A^-_{内}$$

中性物（HA）在跨膜过程中将达到平衡，与 $\Delta\psi$ 无关。因此，平衡时

$$[HA]_{内} = [HA]_{外} \tag{14.4}$$

假设线粒体内外 HA 离子化的平衡常数 K_a 相同，并且 K_a 值极小以致 $[HA] \cong 0$，可忽略不计，则

$$\frac{[H^+]_{外}\,[A^-]_{外}}{[HA]} = \frac{[H^+]_{内}\,[A^-]_{内}}{[HA]} \tag{14.5}$$

即

$$\frac{[A^-]_{外}}{[A^-]_{内}} = \frac{[H^+]_{内}}{[H^+]_{外}} \tag{14.6}$$

因而，ΔpH 可由 $[A^-]_{外}$ 和 $[A^-]_{内}$ 的测定值而计算出。

14.5　线粒体产生的质子数与传递给氧的电子数的比率

化学渗透模型需要有电子流流经电子传递链以使质子从线粒体中释出，由此产生质子电化学-电位梯度。实验中，电子传递链的复合物 IV 可还原氧原子，测定每个氧原子还原过程中所释出的 H^+ 离子数目的测定是非常重要的（H^+/O 比率），因为此比率可用于检验质子传递的机械模型的有效性（见 14.6）。

例 14.9

在无氧条件下，以适当的底物（如 NADH 或琥珀酸）培养线粒体，可测出 H^+/O 比率。加入已知量的 O_2 反应即开始，H^+ 的释出可用 pH 电极测得（以 ΔpH 形式）。此实验的结果如图 14－4 所示。

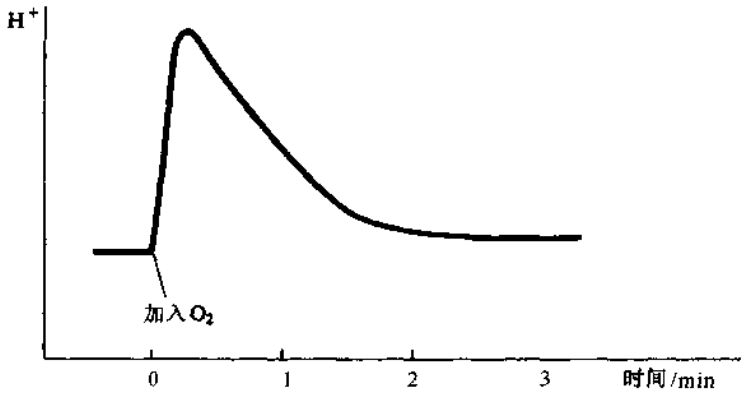


图 14－4　呼吸过程中质子的释出

实验后，数据的处理相当的复杂。线粒体必须允许除 H^+ 以外的阳离子透过。如果不是这样，那么，H^+ 的释出必将导致 $\Delta\psi$ 的增加，从而减少 H^+ 的进一步释出。将 K^+ 和离子载体缬氨霉素加入线粒体制备液中可阻止 $\Delta\psi$ 值的上升。

实验数据分析的复杂性还包括，对于回流回线粒体的 H^+ 部分的修正的必要性；H^+ 可能直接返回线粒体，或通过线粒体内膜的 Na^+/H^+ 反向转运体的运载，或 H^+/磷酸同向转运体的运载（见习题 14.7）。

经复合物 IV 传导的质子传递

复合物 IV 将电子由细胞色素 c 转向 O_2；该过程与质子传递相偶联，H^+/e^- 化学计量为 2。为说明这些数据已提出了两个模型（图 14－7）。目前认为复合物Ⅳ能够起到质子泵的作用。

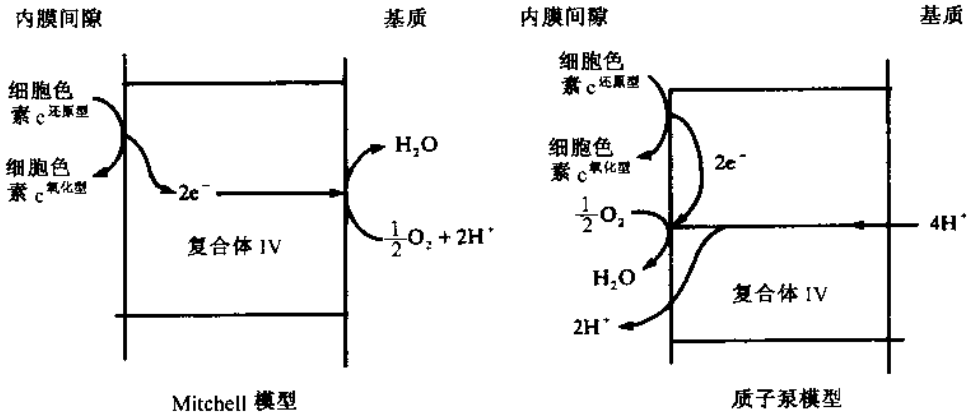


图 14－7　质子传递的两个模型图

问题：当无质子穿越膜时，氧化磷酸化的 Mitchell 模型如何得出数值为 1 的 H^+/e^- 化学计量值？

Mitchell 模型可由下列方程式来描述：

$$2H^+ + 2e^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$$

因此，仅由此化学反应可以看出线粒体内膜的基质侧会有 $[H^+]$ 的净减少。

14.7　ATP 合酶

ATP 合酶存在于所有的能量传导膜中，包括线粒体膜、叶绿体膜和细菌的膜。在有氧呼吸出现之前，酶复合体最可能以原始的厌氧生命体形式存在。在早期的有机体中，其作用相反，是利用由发酵反应生成的 ATP 来建立与离子传递系统相偶联的质子梯度的。

线粒体的电子显微图显示线粒体内膜的基质侧有球形结构突出。这些球形单位可通过相对温和的处理，如低离子强度溶液或尿素的处理，而与膜脱离开。可溶性的微粒被认为是 ATP 合酶的 F_1 组分，它可水解 ATP，但不能合成 ATP，因而被称为 ATP 酶。

例 14.12

ATP 合酶的 F_1 组分由 5 个独立的多肽链组成，分别是 α（M_r = 56 000），β（M_r = 53 000），γ（M_r = 33 000），δ（M_r = 14 000）和 ε（M_r = 6 000），其化学计量式为 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$。ATP 酶活性催化部位在 β 链上，而 δ 和 ε 链则使 F_1 复合体与膜相连。

将 F_1 复合体反加到已用尽 F_1 的膜上可使 ATP 合酶的活性得以修复。F_1 复合体与被称为 F_0 复合体的膜通道相连接，F_0 复合体也由多个亚单位组成。构成 F_0 复合体的多肽链疏水，跨膜形成了质子传递通道，并将质子梯度与 ATP 合成相偶联。此通道似可与亲水残基如丝氨酰基、苏氨酰基和羧基相连接。连接 F_1 与 F_0 的“柄”由被称为寡霉素-敏感性-授予蛋白（OSCP）的多肽的单一拷贝与另一个被称为 F_6 的蛋白的单一拷贝组成。

例 14.13

F_0 复合体的主要亚基是一个较小的多肽（M_r = 5 400），因其中结合有高比例的磷脂而

问题：H^+/e^- 化学计量为 2 是与单纯的化学渗透假设相一致吗？

不一致，化学渗透假设的 H^+/e^- 值为 1.0。此化学计量值可由质子泵机制解释，此机制表示电子转移是与复合物 I 中蛋白质 pK_a 值的变化相偶联的。

经复合物 II 传导的质子传递

复合物 II 介导电子由琥珀酸向辅酶 Q 转移。此过程不与向量质子的转运偶联。

经复合物 III 传导的质子传递

复合物 III 将电子从还原型辅酶 Q 转向细胞色素 c；此过程与向量质子转运相偶联，H^+/e^- 化学计量为 2。

例 14.11

如何解释上述的 H^+/e^- 化学计量？

H^+/e^- 化学计量是生物能学中最有争议的部分之一，与辅酶 Q 的作用相关。最基本的观点是，此辅酶是（$2H^+ + 2e^-$）的流动载体，将复合物 I 和 II 与复合物 III 连接起来的。而辅酶 Q 参与复合物 III 中（$H^+ + e^-$）的转移。1975 年 Mitchell 提出的质子移动 Q 循环（图 14－6）便是表示此过程的模型。此模型符合例 14.10 中的推论（2），即辅酶 Q 是两个环之间（$H^+ + e^-$）的载体。此模型中，还原型辅酶 Q（QH_2）通过半醌自由基（QH·）与氧化型辅酶 Q（Q）相连接。此模型解释了 H^+/e^- 化学计量。

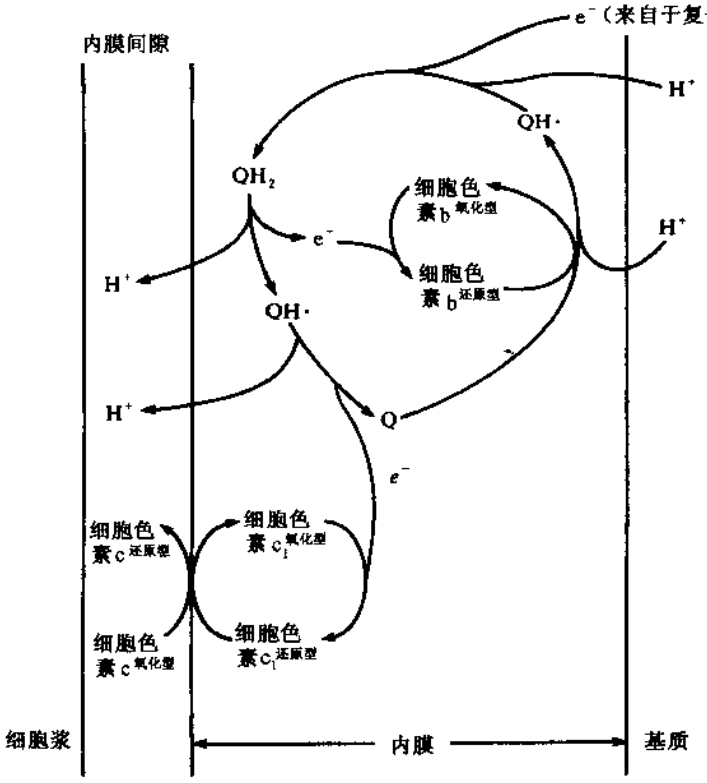


图 14－6　质子移动 Q 循环的示意图

例 14.14

根据上述的概念，已提出多种模型，图 14－8 便是其中之一。基于对 γ 磷酸上标记有 ^{18}O的 ATP 水解的研究而建立了此模型。标记会从释出的 Pi 中丢失，转换到水（$H^{18}OH$）上，因为反应 2 和 －2 之间快速可逆。解偶联剂不影响此丢失，表示 μ_{H^+} 与反应 2 或 －2 无关，也不与 －3 或 －1 相关。

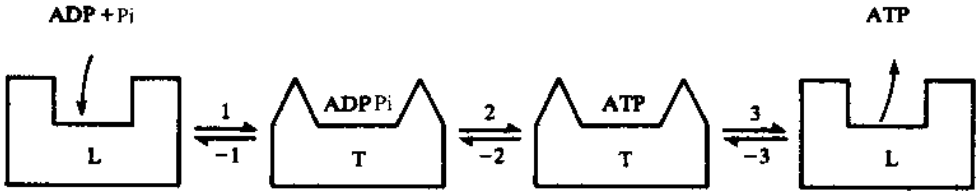


图 14－8　ADP 与 Pi 结合释出 ATP 的模型 L＝松弛结合复合体；T ＝ 紧密结合复合体

ADP 与 Pi 的结合是需要能量的，松弛（L）结合复合体将转化为紧密（T）结合复合体。紧密结合复合体中水的可逆丢失（ATP 合成）或获得（ATP 水解）可不需 μ_{H^+} 的介入。T－结合 ATP 复合体转化为 L－结合 ATP 复合体的过程同样也需要能量，而 ATP 自 L－结合 ATP 复合体中的释出无需附加能量。

基于上述的讨论和 ATP 酶的 X 射线晶体结构，关于环构象变化及亚基转动的最可能的机理，由通过 F_0 复合体的质子传递而得出（图 14－9）。三个 β 亚基以三种独立的状态存在：紧密状态，T，与 ATP 紧密连接，其中 ADP 是磷酸化的；松弛状态，L，可与 ADP 及无机磷酸连接；开放状态，O，释放出 ATP。一旦 ADP 和 Pi 结合到 L 状态上，由质子传递引起的构象变化转换 L 状态为 T 状态，ATP 生成，同时，相邻的 T 亚基转换为 O 状态，使生成的 ATP 释出。第三个 β 链又将 O 转换为 L 状态，准允 ADP 结合上来，以便进行下一轮 ATP 合成。

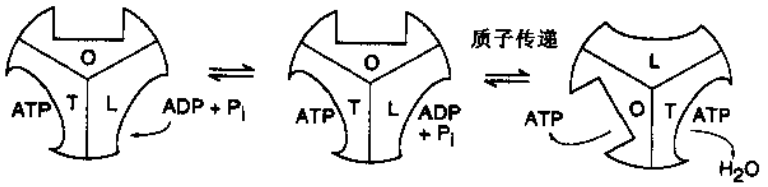


图 14－9　ATP 合酶与 $F_1\beta$ 亚基构象变化相偶联而循环合成 ATP 的模型。构象的变化由 F_0 介导的质子传递而引起。ATP 的合成在“紧密连接”（T）状态下进行，但其仅能从“开放”（O）状态下释出。电化学梯度的能量用于将 T 状态转换为 O 状态。第三个状态，L，可结合 ADP

ATP 合成与质子传递的紧密偶联是依赖于膜对质子的不同透性的，以便 F_0 通道和 ATP 合成为质子再进入线粒体基质提供惟一的途径。膜的物理损伤，或能允许质子分散或电位梯度扩散的化学药物，都将引起质子再进入途径的变更，并且将呼吸作用与 ATP 合成解偶联（见问题 14.5）。

14.9　腺嘌呤核苷酸转入与转出线粒体

虽然 ATP 合成机制尚不完全清楚，但 ATP 的合成是在线粒体基质中进行的，这一点是毫无疑问的。线粒体 ATP 被转运出，进入胞液。一个特异的载体（移位酶，M_r ＝ 40 000）与 ATP 和 ADP 的同时转出与转入线粒体相关联。传递过程受到两种很熟知的毒素的抑制，

被称为蛋白脂质。有多个来源的蛋白脂质形成了穿越线粒体内膜的发夹环，该蛋白脂质包含一段特有的疏水氨基酸序列，此氨基酸序列位于可与 OSCP 或 $F_1\delta$ 组分相互作用的富含电荷的中心短片段的旁侧。

二环己基碳二亚胺（DCCD），通过与蛋白脂质通道环内单个谷氨酸残基上羧基的反应而抑制质子经 F_0 的传递

寡霉素是能抑制整个线粒体呼吸作用的抗生素。在解偶联的线粒体，即有 O_2 的消耗却无 ATP 合成的线粒体内，呼吸作用并不被抑制。因此，与鱼藤酮和氰化物等抑制剂相反，寡霉素并不阻碍呼吸载体的转运。但却通过与膜连 F_0 亚基的相互作用而阻断质子由 F_0 复合体向 F_1 的传递。F_0 中的下标“0”原义表示“寡霉素-敏感性”复合体。

14.8　ATP 合成的机制

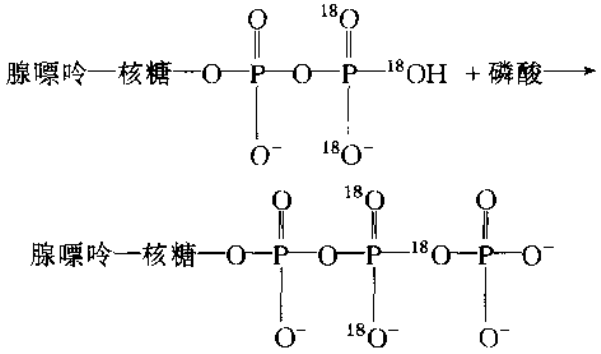
化学渗透假设主要认为跨膜电化学梯度的作用相当与于将能量传递给 ATP 的中间介质；而能量则来源于呼吸链中 NAD^+/NADH 对和 $O_2/2H_2O$ 对之间的氧化还原电位差。三个呼吸复合物 I、III 和 IV 中都发生能量偶联，每一种情况都有完全不同的供体和受体载体的终点电位，驱动质子逆电化学梯度传递。因此，NADH 的氧化导致每个还原为水的 O 原子几乎生成 3 分子 ATP（P/O 比例为 3）。另一方面，琥珀酸的氧化产生 2 分子 ATP，P/O 比例为 2。

电化学梯度是反应的驱动力：

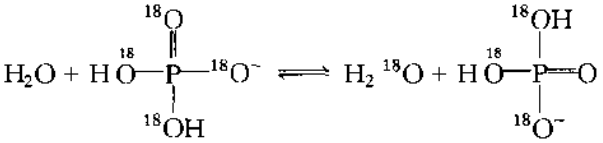
$$ADP + Pi + \Delta\mu_{H^+} \rightleftharpoons ATP + H_2O$$

最近，ATP 酶 F_1 组分的 X-射线晶体结构已以 2.8 的分辨率被测出。三个 α 链和三个 β 链交替地排列在突向柄区域的 γ 亚基的 α-卷曲螺旋上。F_1 的亚基基本上是对称的，因只有一个 γ 亚基对着三个 α 和三个 β 亚基；三个 α 和三个 β 链中的每一个在构象上都略有不同。一个 β 亚基连接 ATP，另一个连接 ADP，而第三个空着核苷酸结合位点。

处于“偶联位点”的高能磷酸化中间体的概念是以早期 ADP 磷酸化机制为特色的。通过对 ^{18}O-标记的反应组分的研究已证明，F_1 上电化学梯度不可能产生此中间体：



已证实连接 ATP β 和 γ 磷酸的氧桥来自于 ADP-OH，并非 Pi-OH，因此与 ADP 酐相关的 F_1 组分的高能衍生物存在的可能性被排除。与磷酸酐相关的 F_1 组分的高能衍生物存在的可能性也被排除，是通过如下所示的 Pi 和水之间 ^{18}O 的交换而证实的，交换会随 ADP 的添加而增多，并不减少。



ATP 合成过程中共价键的形成受 ATP 自身 β 和 γ 磷酸连接的限制。

电化学能量 $\Delta\mu_{H^+}$ 似乎并不被直接利用于共价键的形成，而是用于将 ADP 和 Pi 连接到上 F_1，及用于后续的 ATP 释出过程。

还原反应利用的 NAD^+ 是更为适合的电子受体？

答：

对于 FAD－介导的琥珀酸的氧化，半反应为：

$$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightarrow FADH_2 \qquad E'_0 = 0.05V$$

$$延胡索酸 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 琥珀酸 \qquad E'_0 = +0.03V$$

因此，总反应式为：

$$琥珀酸 + FAD \rightarrow 延胡索酸 + FADH_2$$

E'_0是 0.02V。$\Delta G^{0'}$可由下式算出：

$$\Delta G^{0'} = -nF E_0'$$

$$= -2 \times 96.5 \times 0.02 = -3.86\ kJmol^{-1}$$

而对于 NAD^+ 介导的琥珀酸氧化反应，核苷酸半反应的 E'_0值为 －0.32V，整个反应的 E'_0值为 －0.35V。由此，NAD^+ 介导的琥珀酸氧化反应的 $\Delta G^{0'}$是 $+67.6\ kJmol^{-1}$，反应不可能进行。再参看

$$\Delta G^{0'} = -RT\ln K$$

可见，FAD－介导的琥珀酸氧化反应平衡常数约是 NAD^+ 介导的 10^{12}倍，因而在琥珀酸脱氢酶催化的反应中 FAD 是比 NAD^+ 更适合的电子受体。

电子传递与 ATP 合成的偶联

14.5　解偶联剂是一类阻止线粒体中 ATP 合成却能允许电子传递的化合物。通常可提高线粒体内膜对 H^+ 的通透性，因而驱散 H^+ 梯度。一个常用的解偶联剂是 2，4－二硝基苯酚。此化合物是如何提高线粒体内膜对 H^+ 的通透性的？

答：

在生理 pH 条件下，2,4－二硝基苯酚主要以阴离子 $C_6H_4(NO_2)_2O^-$ 形式存在。线粒体内膜对此阴离子或其质子化形式，$C_6H_4(NO_2)_2OH$ 都是通透的。后者即可携带质子进入线粒体内膜，而后有又以阴离子形式返出线粒体，以便再运载质子进入线粒体。因此，2,4－二硝基苯酚可驱散 H^+ 梯度。

14.6　于线粒体样品中加入 DCCD（二环己基碳二亚胺）可减少 ATP 合成与电子传递。仅后者可以通过加入2,4－二硝基苯酚而回复到正常水平。如何解释这些现象？

答：

DCCD 可阻断质子经 ATP 合酶 F_P 亚基的传递。因此，有质子传递的位置 $\Delta\mu_H$ 值升高，导致质子传递在热力学上不可能发生。另外，DCCD 也可使 ATP 合酶合成 ATP 的功能丧失。而解偶联剂，2,4－二硝基苯酚，使线粒体内膜对质子通透，$\Delta\mu_H$ 值下降，恢复电子传递。然而，2,4－二硝基苯酚却不能修复受 DCCD 损伤的 ATP 合酶的活性。

14.7　绝大部分线粒体都包含活化的 H^+/磷酸同向转运蛋白，此蛋白含有其转运活性必需的巯基。(a) 此转运蛋白是如何使 H^+/O 比率（见例 14.9）的测定更为复杂化的？(b) 巯基的存在是如何用于消除此复杂性的？

答：

(a) 由线粒体排出的质子可与磷酸一同，经 H^+/磷酸转运体而被转运回线粒体。这将引起线粒体所排出的质子的减少，故，H^+/O 比率降低。

(b) 因 H^+/磷酸转运体包含巯基，那么，用可与巯基反应的基团选择试剂如 *N*－乙基顺丁烯二酰亚胺处理线粒体制备液，导致 H^+/磷酸转运体的选择性失活。因此，由 H^+/磷酸转运体介导的质子再进入线粒体的过程则不能发生。实验中，经 *N*－乙基顺丁烯二酰亚胺处理的线粒体，其 H^+/O 比值比未经处理的高。

苍术苷和米酵霉酸，前者是于地中海蓟中发现的葡萄糖苷，后者由假单胞杆菌产生。

例 14.15

转位子可向任一方向移位两个核苷酸。ATP 是以 ATP^{4-}、ADP 则以 ADP^{3-} 的形式被传递。因此，交换的平衡依赖于跨膜的电化学电位差。当电位差是 160mV 时，线粒体外的介质中 ATP/ ADP 比例为 125/1。

问题解答

电子传递链的成分

14.1　于无氧、NADH 存在条件下培养线粒体悬浮液。因氧的引入而引发氧化磷酸化作用，并发现悬浮液中 ATP 浓度增加了 $1.5\times10^{-4}molL^{-1}$，相应于悬浮液在 340nm 波长处的吸收值减少了 0.30，用的是 1cm 光镜的分光光度计。已知 NADH 于 340nm 处的吸光系数为 $6.2\times10^{3}Lmol^{-1}cm^{-1}$，计算每一分子 NADH 的氧化可产生 ATP 分子的数目。

答：

比尔-朗伯方程式（见第 3 章）为：

$$A = \varepsilon Cl$$

其中，A 为溶液的吸光度；ε，为吸光系数；C，为浓度，以 $molL^{-1}$表示；l，则是光镜的长度，以 cm 表示。将方程式重排，并将上述已知数值代入式中，得到

$$\Delta C = \frac{\Delta A}{\varepsilon l}$$

$$\Delta[NADH] = \frac{\Delta A_{340nm}}{\varepsilon_{340nm}\times 1cm}$$

$$= \frac{0.30}{6.2\times10^{3}L\ mol^{-1}cm^{-1}\times 1cm} = 4.84\times10^{-5}molL^{-1}$$

此值与［ATP］的变化值相比较（$1.5\times10^{-4}molL^{-1}\div 4.84\times10^{-5}molL^{-1}$）得出每一分子 NADH 的氧化可产生 3.1 分子 ATP；非常接近于理论推算值 3.0。

14.2　肌肉组织中有两种 3-磷酸甘油脱氢酶：一种在胞浆中，利用 NADH，一种是黄素-核苷酸依赖的线粒体酶。这两种酶有何代谢意义？

答：

这两种酶为 NADH 还原当量（在细胞液中由糖酵解过程产生）传递入线粒体而提供了穿梭机制。细胞液中的酶催化下列反应：

$$磷酸二羟丙酮 + NADH + H^{+} \rightleftharpoons NAD_{+} + 3-磷酸甘油$$

3-磷酸甘油穿过线粒体膜，被线粒体内的酶氧化又成为磷酸二羟丙酮：

$$3-磷酸甘油 + FAD \rightleftharpoons 磷酸二羟丙酮 + FADH_2$$

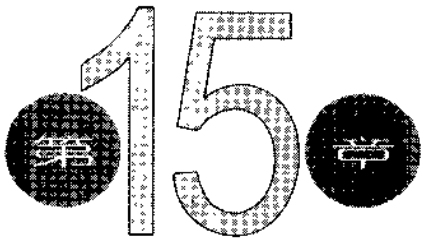
$FADH_2$ 于辅酶 Q 处进入电子传递链，同时二羟丙酮又返回细胞液中。尽管此穿梭效能较低，每分子 $FADH_2$ 的氧化仅产生 2 分子 ATP，而每分子 NADH 的氧化则产生 3 分子 ATP，但此穿梭却为细胞液中 NAD^{+} 的再生成提供了途径。细胞液内 NAD^{+} 的存在是糖酵解（图 11-20）能够继续进行的基本要素。

14.3　如何用实验方法区分铁硫蛋白中的两种类型的硫原子？

答：

铁硫蛋白中与铁相连接的硫原子因是酸不稳定的，因而在低 pH 条件下可被除去；但来自于半胱氨酸残基的硫原子因与半胱氨酸残基的 β-碳原子共价相连而不是酸不稳定的。

14.4　琥珀酸脱氢酶催化的反应中，为什么 FAD 比可被柠檬酸循环（见 12 章）中其他氧化



氮代谢

15.1 氨基酸的合成及食物来源

动物生长依赖于从其他动植物中获取固（即还原的）氮；而植物则是依赖于细菌的固氮作用。人类需要固氮，必须是来源于饮食（一般以蛋白质的形式）的固氮，主要用于蛋白质和核酸的合成，也用于诸如卟啉与磷脂等特殊代谢物的合成。

我们所吸收的蛋白质（或固氮）的量决定了我们的氮平衡状态。与其他动物一样，人类即使摄取不含蛋白质的膳食也会排泄出含氮化合物，因为并非所有的含氮化合物都能循环利用。如此会造成负氮平衡。成人为保持氮平衡所需的蛋白质的量不易确定，因为蛋白质中并不包含所有的氨基酸，尤其是对动物代谢也同等重要的植物蛋白。

例 15.1

对于饮食要求，为何植物蛋白不如动物蛋白有益？

若由饮食补充氮，谷物蛋白只有 70% 的效价。原因是其中缺乏一种人类必需氨基酸（见本部分中的“氨基酸合成”），赖氨酸。因此，单一蛋白质来源（如仅来源于玉米）的膳食会导致营养不良。解决此问题的方法之一是食用富赖氨酸的谷物。其他植物蛋白，尤其是来源于荚果种子（如豌豆和菜豆）的，都缺乏含硫氨基酸。合理的素食膳食可利用谷物与荚果种子求得氮平衡。

对于一个 70kg 的人，为保持氮平衡每天所需蛋白质的量为 28g，即 3.8g 的氮。这是通过 6～7 天摄食不含蛋白质的饮食，测定 N 的排出量而估算的。若摄入的蛋白质来源于谷物，则每日摄取量要增加到约 40g。因为谷物蛋白中必需氨基酸的量有所变化，故需增加蛋白摄入量。生长中的儿童需要的蛋白质量较大，推荐剂量为每日每公斤体重 0.6g。

问题：饮食中蛋白质过量有害吗？

蛋白质摄入量较高的爱斯基摩人，寿命虽比欧洲人短，但这与膳食蛋白没有明显的关连。他们摄食的饱和脂肪的量也较高。

固氮作用

氮的固定化是仅次于光合作用的最基本的生化过程。此过程中大气中的氮被还原为氨。固氮作用是由蓝绿藻，部分酵母菌，尤其是细菌来完成的。氮的还原反应

$$N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3 \qquad \Delta G^{0'} = -33.5 kJmol^{-1}$$

是放能反应。由于 N_2 的化学不活泼性，此过程在工业上是利用有效的催化剂，并且加温（600℃）加压（1 000 大气压）来完成的。而生物学过程是在 1 大气压和～25℃条件下进行的。细菌内，反应是由固氮酶催化的。

例 15.2

反应中氢来源于何处？生物学系统是如何克服 N_2 的化学不活泼性？

质子是氢的来源，并且推测是 ATP 的水解协助了热力学不可能的中间体的形成从而克

14.8　在很多青年动物背部的皮肤下发现有被称为棕色脂肪的脂肪组织。这一组织中，线粒体由于 NADH 氧化而合成 ATP 的 P/O 比值小于 1。那么，棕色脂肪组织的生理功能是什么？

答：

上述的 P/O 比值已清楚地表明棕色脂肪线粒体中 ATP 的合成是不与电子传递相偶联的。因此，电子传递过程中由线粒体排出的质子必须再进入线粒体，并且不伴随有 ATP 的合成。于此再进入的过程中，能量以热能的形式散出，以利于年轻动物的保暖。小生物体由于比面值高，可通过传导与辐射过程而快速散去热量。

14.9　某一实验中，纯化的 F_o 蛋白被混合入人造磷脂泡中。这些泡被前负荷 K^+，而后在悬浮液中加入缬氨霉素，则泡可吸取质子。但在不含 F_o 蛋白的磷脂泡中无 H^+ 被吸收。这些现象的机理是什么？

答：

K^+ 载体，缬氨霉素的加入，使 K^+ 顺着其浓度梯度溢出而产生扩散电位。故，F_o 蛋白允许囊泡吸收 H^+（若缺乏 F_o 蛋白则膜不对 H^+ 通透）以抵消所产生的扩散电位。

14.10　某一实验中，给予线粒体悬浮液足够的氧和丙酮酸，但不提供 ADP，则氧的消耗率很低。如此，测出电子传递链各组分的还原态的相对量：NAD，100%；辅酶 Q，40%；细胞色素 b，38%；细胞色素 c，14%；细胞色素 a，0%。如何用这些数据来确定氧化磷酸化的位置？

答：

基于习题 14.6 中所讨论的原因，ADP 的缺乏实际上是电子传递的抑制剂。因此，通过运用交换原理（见第 10 章），电子传递链 NAD 与辅酶 Q，细胞色素 b 和 c，细胞色素 c 和 a 之间，还原量有较大的差别。故，ADP 的缺乏必在这些位点抑制电子的传递；事实上，这些正是电子传递过程中引起 ATP 合成的质子排出位点。

补充问题

14.11　对于糖酵解、柠檬酸循环和氧化磷酸化过程都正常进行的细胞匀浆液，每分子（a）丙酮酸，（b）NADH，（c）葡萄糖和（d）磷酸烯醇式丙酮酸可产生多少分子的 ATP？

14.12　以 NADH 为电子供体合成 ATP 时，2,4－二硝基苯酚对 P/O 比率有何影响？

14.13　已知线粒体内 pH 值为 7.8，假设线粒体体积与直径 1.4×10^{-6}m 的球体相当，计算线粒体内质子的数量。

14.14　为什么摄入解偶联剂，如2,4－二硝基苯酚，会引起发汗，体温升高，若长期食用（数周），则会导致体重下降？（注：这是非常危险的体重控制法）。

14.15　如何能够区分电子传递链中不同的细胞色素？

14.16　铁硫蛋白中的 Fe^{3+} 有电子自旋共振（ESR）信号，而 Fe^{2+} 则没有。假设有一能通过 NADH 的氧化合成 ATP 的线粒体制备液；提供鱼藤酮、抗霉素和 KCN；并且可以使用 ESR 分光仪。如何确定电子传递链中的哪个复合物包含铁硫蛋白？

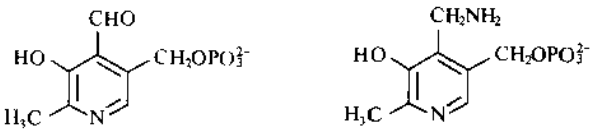
14.17　计算从还原型细胞色素 c 到氧的电子流的 $\Delta G^{0'}$ 值。

14.18　亚硝酸是氰化物中毒的有效解毒剂。为什么？（提示：亚硝酸是可将血红素中的 Fe^{2+} 转化为 Fe^{3+} 的氧化剂。）

14.19　将氧加入正在无氧条件下代谢葡萄糖的细胞中，会引起（a）葡萄糖消耗率的降低，（b）乳酸蓄积终止。现象（b）被称为 Pasteur 效应。解释为什么在葡萄糖和乳酸的代谢中会发生如此的变化。

转氨作用

转氨作用是由以磷酸吡哆醛为辅基的氨基转移酶催化的，此过程中氨可逆地转换于氨基酸与 2 -酮酸之间。磷酸吡哆醛与磷酸吡哆胺是维生素 B_6（图 15 - 1）的辅酶形式。

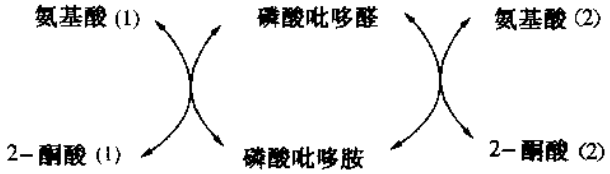


(a) 磷酸吡哆醛　　(b) 磷酸吡哆胺

图 15 - 1　磷酸吡哆醛与磷酸吡哆胺的结构

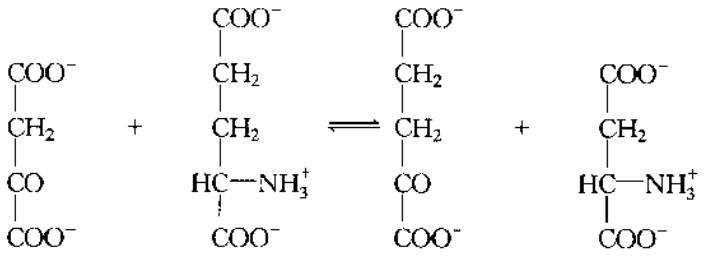
问题：转氨作用中辅酶有何功能？

磷酸吡哆醛上的醛基可接受来自于某一氨基酸的氨基，形成希夫氏碱（见第 1 章）。此过程中氨基酸被转化为 2 -酮酸，磷酸吡哆醛被转化为磷酸吡哆胺。而后，磷酸吡哆胺上的氨基可转移给另一个 2 -酮酸，使其成为氨基酸。在第二个反应中，磷酸吡哆胺又被转回成磷酸吡哆醛。

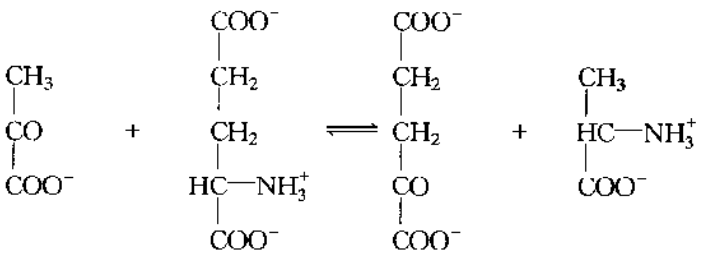


总反应是：氨基酸(1) + 2 -酮酸(2)⟹2 -酮酸(1) + 氨基酸(2)

2 -酮戊二酸是氨基的常规受体。在转氨酶催化的反应中，2 -酮戊二酸被转移上氨基而成为谷氨酸。目前至少有 13 种不同的转氨酶，但对它们的特异性尚不十分清楚。最重要的有（a）天冬氨酸转氨酶，催化下列可逆反应：



(b) 丙氨酸转氨酶，催化下列反应：



例 15.3

组织损伤或细胞死亡后，天冬氨酸转氨酶与丙氨酸转氨酶都会被释入血液中。因而，若心脏或肝脏受损，如心脏病或肝炎，可分别用这两种酶来诊断。此时其他酶也可被释入血液

服 N_2 的化学不活泼性。氮的还原反应需要 8 个电子的参与，且伴有 H_2 的释出。

$$N_2+8e^-+8H^+ \xrightarrow{16(ATP+H_2O)\quad 16(ADP+P_i)} 2NH_3+H_2$$

电子可由多个供体供给，包括 NADH、黄素蛋白和 NADPH。

最终，所有的高等有机物都是依赖于细菌产生的氨而进行氮代谢的。

问题：高等有机物如何获取氨？

许多植物，特别是豆科植物（如豌豆和菜豆），与生存于其根部特殊节内的固氮菌有着共生的关系。目前约有 13 000 种豆科植物，它们中都有根瘤菌属的共生菌。一些昆虫（白蚁和蟑螂）的肠道内也有共生的固氮菌。

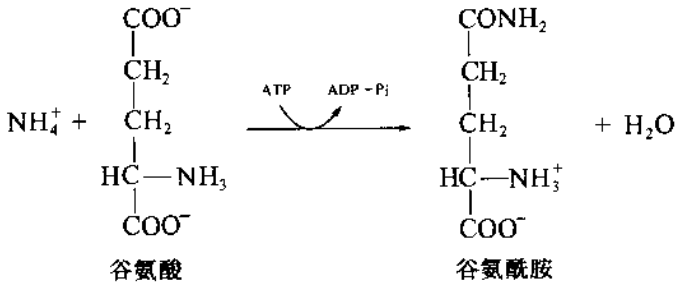
氨的同化作用

在谷氨酸脱氢酶的催化下，氨可与 2-酮戊二酸缩合成为谷氨酸；谷氨酸脱氢酶在肝脏和肾脏中活性最高。由 2-酮戊二酸与氨生成谷氨酸的反应如下：

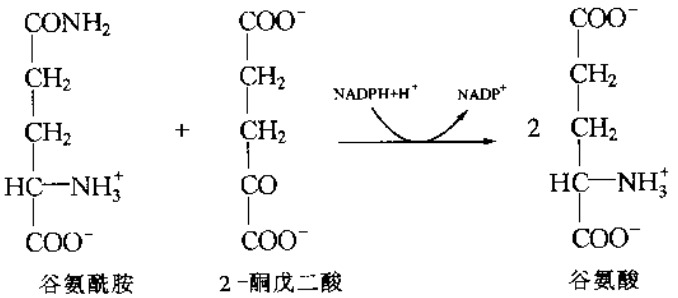
$$NH_4^+ + 2\text{-酮戊二酸}^{2-} + NADPH + H^+ \rightleftharpoons \text{谷氨酸}^- + NADP^+ + H_2O$$

谷氨酸脱氢酶也可将 NAD^+ 用于谷氨酸的降解过程。此反应是可逆反应；净流量的方向仅由反应物的相对浓度即可测出。故此反应有两个同等重要的功能：氨的同化作用或代谢物的脱氨基作用。

通过谷氨酰胺合成酶与谷氨酸合成酶共同催化的反应，一些细菌也能产生谷氨酸。谷氨酰胺合成酶，正如其名称所暗示的那样，能够催化所有生命体内谷氨酰胺的合成。人类肝脏中该酶活性最高；谷氨酰胺从肝脏经血液被转运至其他组织。



而人体内没有的、仅存于细菌内的谷氨酸合成酶，可催化谷氨酸的生成：



此复合酶系可被蓝绿藻和根瘤菌所利用。

谷氨酰胺的酰胺基为许多含氮化合物，如嘌呤与嘧啶（见 15.6）的合成提供了氨基。

经胞内的转氨作用，谷氨酸可为其他氨基酸的合成提供氨基。而这些合成的氨基酸又被用于蛋白质的合成及氮代谢的其他方面。绝大部分动物都是依靠动植物蛋白的固氮而进行氮代谢的。

问题：非必需氨基酸由何处合成而来？

这些氨基酸的合成依赖于适当的碳骨架的可得性与氨的来源。对于大部分非必需氨基酸来说，葡萄糖是碳骨架的最终来源。两个必需氨基酸，苯丙氨酸与甲硫氨酸，分别被用于合成非必需氨基酸酪氨酸与半胱氨酸。由于氨可于摄食后获得，因此，在人体不能合成某种氨基酸碳骨架时，必须由膳食中获取该氨基酸。

氨基酸合成中的 2 -酮酸的合成

非必需氨基酸的合成需要一定的 2 -酮酸；如表 15.2 所列。

四个氨基酸：丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸，是由相应的酮酸经转氨基作用而生成的。其他的非必需氨基酸则由这四个氨基酸衍生。因其在代谢方面或临床上的重要性，下面详述丝氨酸与酪氨酸的合成过程；丝氨酸的合成是叶酸代谢的基础，而参与合成酪氨酸的酶的缺乏会导致苯丙酮酸尿症。

表 15.2　非必需氨基酸合成所需要的 2 -酮酸

2 -酮酸	氨基酸
丙酮酸	丙氨酸
草酰乙酸	天冬氨酸、天冬酰胺
2 -酮戊二酸	谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、精氨酸*
丙酮酸、3 -羟丙酮酸	丝氨酸

* 表示仅对于婴儿与儿童是必需的。

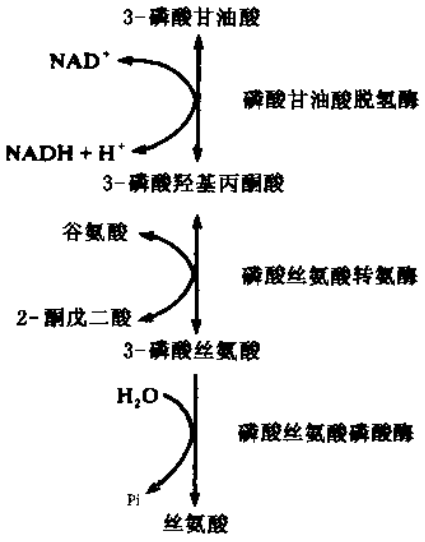


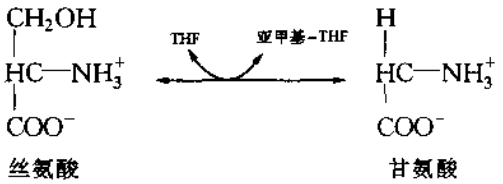
图 15 - 3　丝氨酸合成的主要途径

精氨酸

精氨酸是在尿素生成过程中由天冬氨酸和鸟氨酸合成的。精氨基琥珀酸合成酶与裂解酶分别催化缩合及断链反应，形成精氨酸（见 15.5）。

丝氨酸

丝氨酸是由 3 -磷酸甘油酸产生的（图 15 - 3）。丝氨酸也可在丝氨酸羟甲基转移酶催化的反应中由甘氨酸转化而来：



N^5，N^{10}-亚甲四氢叶酸（亚甲基- THF）是叶酸的辅酶之一（见 15.7）。此反应虽是可逆的，实际上，净通量通常是向着甘氨酸合成的方向。因此，甘氨酸既可由葡萄糖生成，也可由丝氨酸产生。

酪氨酸与半胱氨酸的合成

两种非必需氨基酸，酪氨酸与半胱氨酸，可由必需氨基酸衍生而来，或被认为是必需氨基酸的降解产物，因为它们是这些必需氨基酸正常降解的中间体。通过摄食便可获得足够的

中。例如，血浆中肌酸激酶或乳酸脱氢酶同工酶的出现是心肌受损的特征表现。

转氨酶多样化的代谢特性尚不完全清楚。

转氨酶在细胞浆中活性最高，也存在于线粒体中，但线粒体中不含谷氨酸脱氢酶。转氨酶与谷氨酸脱氢酶催化氨基酸代谢的中心反应。主要的转氨酶与谷氨酸脱氢酶在各组织中的浓高于其他酶如糖酵解途径中的酶。二反应的可逆特性使氨基能够快速交换并生成 2 -酮酸，如图 15 - 2 所示。

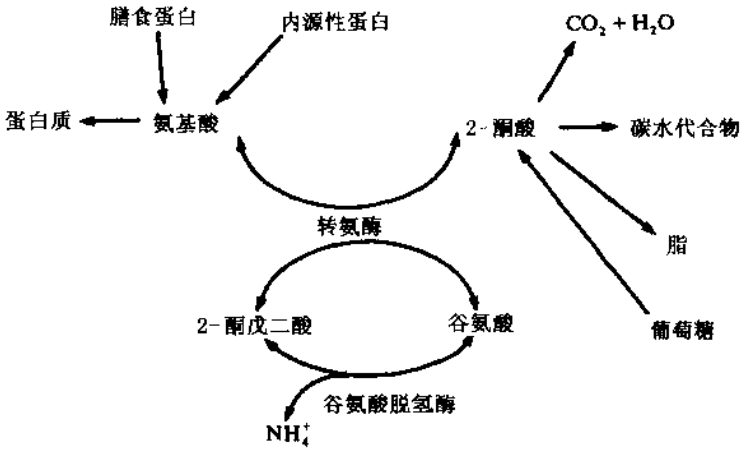


图 15 - 2　转氨酶与谷氨酸脱氢酶在氮代谢中的主要作用

问题：在饥饿状态下，图 15 - 2 所示的代谢途径如何运转？

在极其饥饿的状态下，蛋白质与碳水化合物二者都供给不足。净效应则是内源性蛋白质（来源于肌肉）被水解，释出氨基酸以供蛋白质合成及氧化产能。由转氨酶催化产生的 2 -酮酸或进入糖异生途径（见第 11 章）或被代谢为 CO_2 与 H_2O（见第 12 章）。谷氨酸脱氢酶则再次催化由氨基酸降解下来的氨基生成氨的反应。

氨基酸合成

用于蛋白质合成（见第 17 章）的 20 种氨基酸是由 RNA 碱基密码子编码的。生命体的生存和生长依赖于蛋白质合成，即依赖于所有 20 种氨基酸的供给。高等植物能够合成这 20 种氨基酸，但一些微生物与高等动物只能合成其中一部分。人类自身可合成 20 种氨基酸中的 10 种，其余的必须由饮食供给，通常以摄入植物或动物蛋白的形式获取。人体不能从头合成但却又是生命必需的氨基酸被称为必需氨基酸。而那些人体能够合成的则称为非必需氨基酸。表 15.1 列出了必需氨基酸与非必需氨基酸。

表 15.1　人体的非必需与必需氨基酸

非必需的	必需的
谷氨酸	异亮氨酸
谷氨酰胺	亮氨酸
脯氨酸	赖氨酸
天冬氨酸	甲硫氨酸
天冬酰胺	苯丙氨酸
丙氨酸	苏氨酸
甘氨酸	色氨酸
丝氨酸	缬氨酸
酪氨酸	精氨酸*
半胱氨酸	组氨酸

* 表示仅对于婴儿和儿童是必需的。

酶原

蛋白水解酶被分泌入胃液，或由胰腺分泌出被称为酶原的无活性的前体物。如胰蛋白酶，其酶原为胰蛋白酶原，是在胰细胞的内质网上合成的，由酶原粒分泌入导管，再进入十二指肠。酶原粒于高尔基体内产生，由脂蛋白膜包裹的胰蛋白酶原分子组成。胰细胞也可产生胰蛋白酶抑制剂，以确保机体不进行自身消化。

例 15.5

患胰腺炎时，偶尔会在腮腺炎发作之后患上此病，由胰腺分泌的蛋白水解酶过早活化，可消化胰细胞。

蛋白质进入胃后，能够刺激激素胃泌素的释出，胃泌素又可引起膜壁细胞分泌盐酸及主细胞分泌胃蛋白酶原（图 15－5）。胃蛋白酶原是另一种酶原（所有酶原名称均以 pro－为字头或以－ogen 为字尾），可于胃液内被转化为有活性的胃蛋白酶。

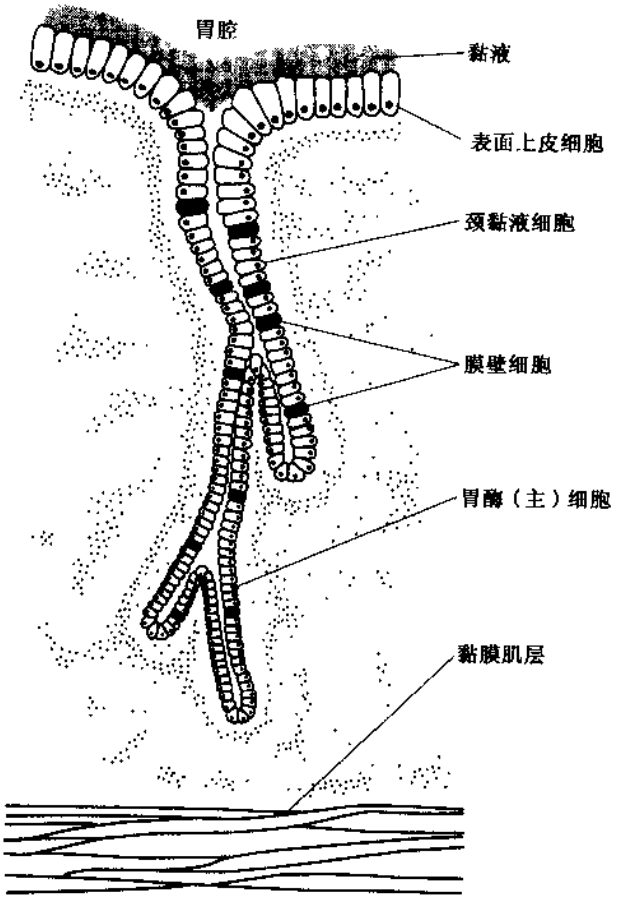


图 15－5　胃腺示意图

问题：盐酸在消化过程中起何作用？

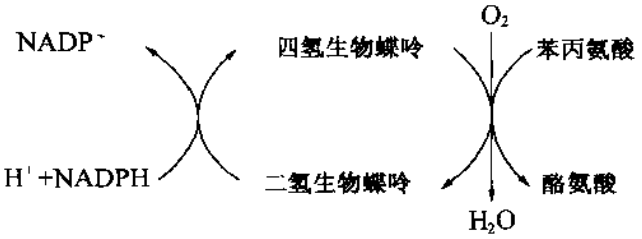
盐酸可使胃内容物的 pH 值降至约 pH 2，能杀死大部分微生物，并将蛋白质变性，以使肽键更利于酶的水解。

胃内容物通过小肠时，低 pH 会引起小肠细胞分泌激素胰泌素。胰泌素又促使胰腺分泌碳酸氢钠，以中和盐酸，并使水解酶，胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶及羧肽酶在最适 pH 7－8 的条件下发挥功效。

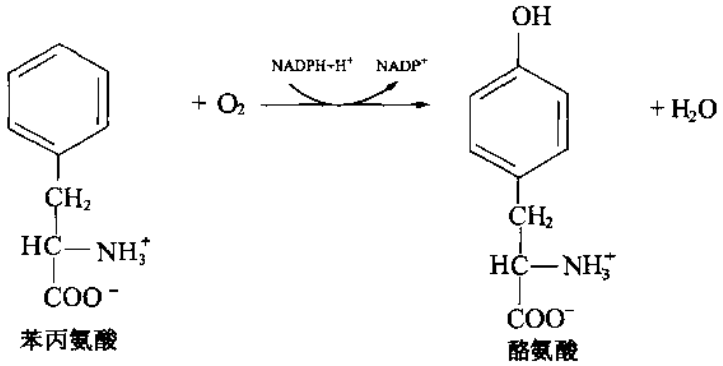
两种必需氨基酸苯丙氨酸和甲硫氨酸，由此可合成酪氨酸与半胱氨酸。

酪氨酸

酪氨酸可由苯丙氨酸合成而来，反应需苯丙氨酸羟化酶的催化，该酶能够催化两个反应。反应中的还原力由 NADPH 提供，而氧则源于氧分子。



总反应为



例 15.4

第一个酶（二氢生物蝶呤还原酶）催化氢转移向二氢生物蝶呤，随后二氢生物蝶呤被还原为四氢生物蝶呤。第二个酶是含 Fe^{3+} 的羟化酶，能够催化 O_2 的还原，即一个氧原子与苯丙氨酸结合形成酪氨酸，另一个则生成水。同时，四氢生物蝶呤被氧化为二氢生物蝶呤。苯丙氨酸羟化酶是混合功能氧化酶的一个实例。遗传性苯丙氨酸羟化酶的缺失使得苯丙氨酸不能被转化为酪氨酸而蓄积，但能够以苯丙酮酸的形式排出。这种情况会影响幼小的婴儿，被称为苯丙酮酸尿症，与严重的智力迟钝相关。

生物蝶呤，如同叶酸（见 15.7，图 15－19），含有蝶呤环（图 15－4）。

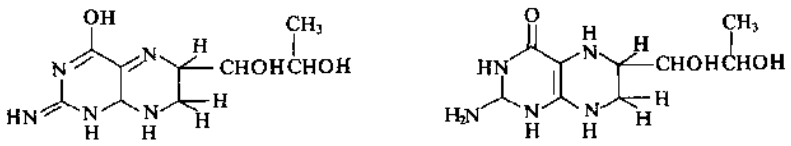


图 15－4　生物蝶呤衍生物的结构

15.2　蛋白质的消化

膳食蛋白是高等动物固氮的主要来源。在消化过程中，蛋白质经胃及小肠内一系列水解酶的作用而水解为肽和氨基酸，被胃肠腔所吸收。这些酶总称为蛋白水解酶，或蛋白酶，属于水解酶类（见第 8 章）。

糜蛋白酶原，是一个由 245 个氨基酸残基组成的单多肽链，可被转化为 α-糜蛋白酶，α-糜蛋白酶由三条多肽链构成，此三条多肽链是由糜蛋白酶原一级结构中 5 个二硫键中的两个连接而成的。π-和 δ-糜蛋白酶也有水解活性。与此相比较，羧肽酶原转化为羧肽酶的过程中只有一个氨基酸被水解脱去。

蛋白酶的特异性

理论上，多肽链中某一氨基酸残基可通过 20×20 种不同的结合方式与另一氨基酸残基相邻。如果每一种可能的结合都需要一个特异的蛋白酶，那么，将需要 400 种不同的蛋白水解酶。然而，蛋白水解酶的特异性并不严格，主要由带相似特征侧链（如碱性或非极性）的氨基酸基团决定，因此，只有少量不同类型的蛋白酶存在。

问题：什么因素决定蛋白水解酶底物专一性？

所有的蛋白水解酶都可催化肽键的水解：

$$R—CO—NH—R' + H_2O \rightleftharpoons R—COO^- + NH_3^+—R'$$

专一性是由肽链中构成被水解的肽键的两个氨基酸所带侧链确定的。对于内肽酶，为肽键提供羧基的氨基酸的侧链决定了底物是否可与酶结合。而，糜蛋白酶则水解由芳香族氨基酸提供羧基的肽键，这类氨基酸有苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸。表 15.3 列出了酶的专一性。

表 15.3　蛋白水解酶的专一性

酶的名称	专一性
胃蛋白酶	Phe、Tyr、Trp；也可是 Leu、Glu、Gln
胰蛋白酶	Lys、Arg
糜蛋白酶	Phe、Tyr、Trp
羧肽酶 A	带大体积、非极性羧基末端的氨基酸残基
弹性蛋白酶	Ala、Gly、Ser
氨肽酶	任意带氨基末端的氨基酸残基

问题：胰蛋白酶在催化机制上有相似性吗？

四个胰蛋白酶中的三个（胰蛋白酶，糜蛋白酶和弹性蛋白酶）都被称为丝氨酸蛋白酶，因为它们的活性都是由处于活性位点的丝氨酸残基侧链决定的。此丝氨酸残基攻击肽键的羧基并切断肽键，生成脂酰-酶中间体（见第 8 章）。该中间体中的酯键将在第二步骤中被水解：

$$RCONHR' + 酶\text{-}CH_2OH \rightleftharpoons RCOOCH_2\text{-}酶 + R'NH_2$$

$$RCOOCH_2\text{-}酶 + H_2O \rightarrow RCOOH + 酶\text{-}CH_2OH$$

例 15.7

蛋白水解酶不同的专一性归咎于结合位点的袋的特异性（图 15－8）。酶表面的袋可容纳底物中易切割键的羧基侧的氨基酸残基侧链。如，位于糜蛋白酶袋中的丝氨酸残基在胰蛋

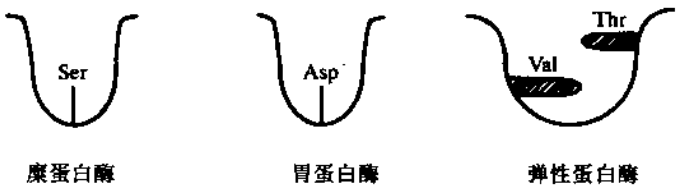


图 15－8　底物专一的袋

例 15.6

有多种肽类激素作用于消化道内：胃泌素刺激胃酸的分泌；胰泌素和抑生长激素抑制胃泌素的产生。缩胆囊素与抑生长激素能够抑制胃酸的直接分泌，前者可引起胆囊收缩，将胆汁排入十二指肠。

十二指肠内，胰酶原，胰蛋白酶原、糜蛋白酶原、弹性蛋白酶原及羧肽酶原经过肠肽酶与胰蛋白酶的作用而被转化为有活性的酶，如图 15－6 所示。这些酶原的活化过程包括肽键的断裂和肽的脱去，使得构象发生变化，从而产生功能活性位点。

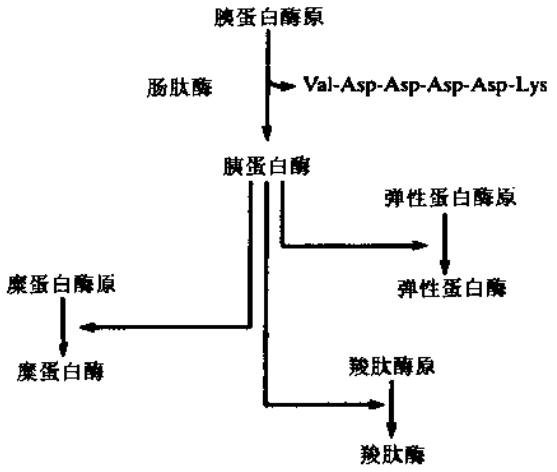


图 15－6　胰酶原的活化过程

问题：酶原活化过程中实际化学变化的结果是什么？

胰蛋白酶原、糜蛋白酶原、弹性蛋白酶原及羧肽酶原都是以 M_r 为25 000～30 000的单一多肽链形式被合成的。活化过程的最初步骤是胰蛋白酶原 N 端一段六肽的水解。水解产生了胰蛋白酶，是由肠肽酶催化的，而肠肽酶则是一类存在于小肠刷状缘细胞膜上的糖蛋白酶。

问题：除胰蛋白酶原以外，其他酶原是如何被活化的？

活化过程已被研究得比较透彻；图 15－7 所示的是糜蛋白酶原的活化过程。

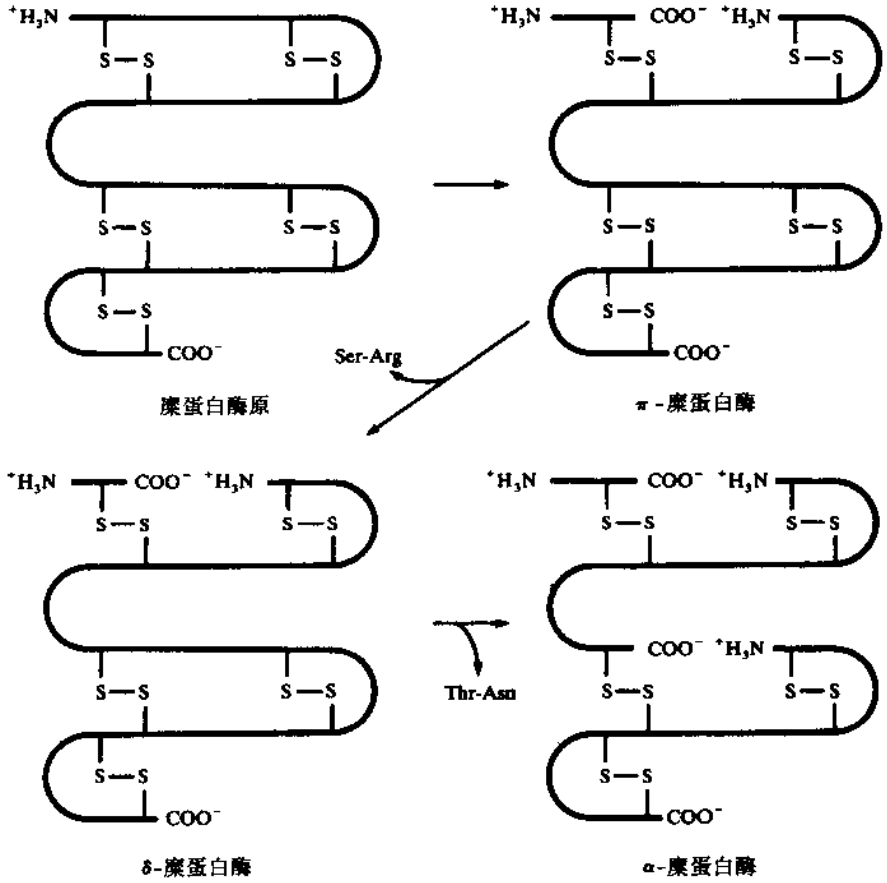


图 15－7　糜蛋白酶原的活化过程

15.4　氨基酸的分解代谢

氨基酸的分解代谢相当复杂；对于任何实用概论，各种氨基酸之间存在很大的差别。

除亮氨酸以外，其余氨基酸的碳骨架都可被用于糖异生途径。图 15－10 总结了氨基酸碳骨架的去向。

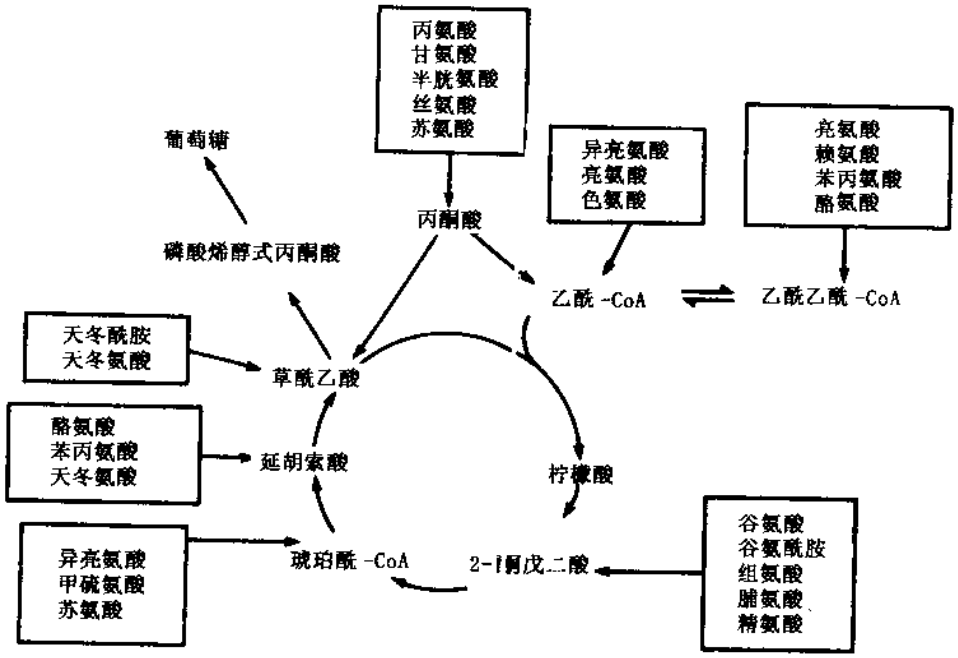
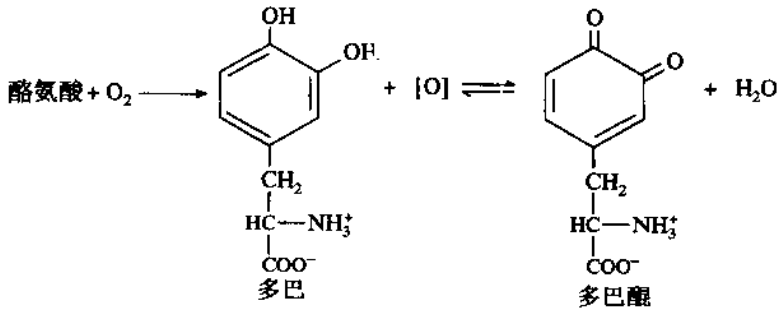


图 15－10　氨基酸碳骨架的去向

所有的、最终因生成丙酮酸而进入糖异生途径的氨基酸被成为生糖氨基酸。惟有亮氨酸，不能产生糖异生途径的任何中间代谢物（即是生酮氨基酸），被降解为乙酰乙酸和乙酰-CoA。一些氨基酸，苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸及异亮氨酸，既是生糖也是生酮氨基酸。因此，大部分氨基酸都是生糖氨基酸。单一氨基酸代谢过程从一步反应到多步反应的都有，如天冬氨酸、谷氨酸和丙氨酸利用适当的转氨酶只进行一步反应，而芳香族氨基酸和赖氨酸则进行多步代谢反应，酪氨酸需要经过四步方可降解为乙酰乙酸与延胡索酸。

例 15.9

自身为苯丙氨酸降解产物的酪氨酸，最初经含铜的酪氨酸酶的作用而被转化为 3，4－二羟苯丙氨酸（多巴）与相应的多巴醌。酪氨酸酶存在于黑色素细胞中，是一种混合功能氧化酶。可催化下列反应：



多巴醌在肾上腺髓质中被转化为去甲肾上腺素和肾上腺素（图 15－11）。

白酶袋中被天冬氨酸残基所取代。于是，带阳离子的精氨酸和赖氨酸残基能够替代大体积的芳香族残基而结合到胰蛋白酶袋中。糜蛋白酶中的两个甘氨酸残基在弹性蛋白酶中则被缬氨酸与苏氨酸取代。缬氨酸和苏氨酸因侧链较大而阻碍底物与袋的结合，因而弹性蛋白酶只能水解附有小的、不带电荷的侧链的肽键。

胃蛋白酶和胰蛋白酶能够催化食物蛋白转化为肽与氨基酸。肠黏膜中的氨肽酶及二肽酶几乎将肽完全水解为氨基酸，部分肽，尤其是含有谷氨酸的肽，可以游离氨基酸的形式进入肠黏膜细胞。氨肽酶能够自肽的 N 端水解去除氨基酸。

图 15－9 总结了消化过程中蛋白质的水解。

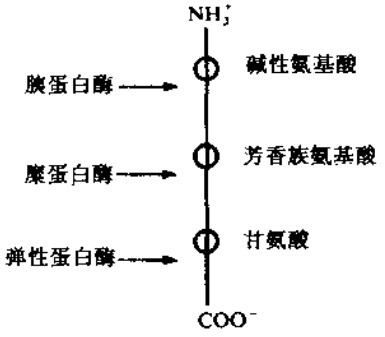


图 15－9　消化过程中蛋白质分解为氨基酸

氨基酸的转运

氨基酸、二肽及部分三肽可通过肠黏膜细胞刷状缘膜而由肠腔被转运入细胞质中，随后肽被进一步水解为氨基酸。肽和氨基酸的转运是很活跃的，与葡萄糖的转运类似；即要与 Na^+ 一同，经特异的 Na^+ 同向转运蛋白的运载才能穿越肠细胞膜。在肠腔和黏膜细胞的胞浆之间，存在 Na^+ 浓度梯度，此浓度梯度是由与毛细血管相邻的细胞的基质中的 Na^+/K^+-ATP 酶维持的；Na^+/K^+-ATP 酶将 Na^+ 泵出细胞，进入血液。因而细胞内的 Na^+ 浓度低于肠腔内的，以确保氨基酸与肽能够随 Na^+ 的进入而被转运进来。至少有 7 种不同的转运蛋白参与氨基酸的吸收过程。

例 15.8

7 种转运蛋白是如何运载 20 种不同的氨基酸的？

转运蛋白具有重叠特异性。如，一种转运蛋白（被称为 L 系统）可转运亮氨酸及带有支链或芳香侧链的中性氨基酸，另一种（Ly 系统）则可转运碱性氨基酸，还有一种低活性的载体（二羧酸系统）可转运二羧氨基酸。

一部分氨基酸通过选择性转运蛋白而进行易化扩散，进入血流，随血液流经肝脏与其他器官并被它们吸收。其余的，尤其是谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸及天冬酰胺，会被消化道细胞代谢而产能。

15.3　氨基酸代谢动力学

除了食物蛋白的水解可产生或合成氨基酸以外，氨基酸亦可来自于组织蛋白的水解，如肠黏膜蛋白或饥饿状态时肌肉蛋白的水解。氨基酸可被用于蛋白质的合成；也可进入糖异生或脂肪生成途径；还可被降解而提供能量；也可用于合成一些化合物，如嘌呤、嘧啶、卟啉、肾上腺素和肌酸。

上述这些代谢活动是通过氨基酸与蛋白质的转换而进行的，此转换过程如同脂类与碳水化合物的转换一样快速。一个成年男性，每天约有 400g 的机体蛋白被更换。其中，50g 用于更换消化酶（见 15.2），6g 用于更换血红蛋白（见 15.8）。血浆中游离氨基酸的浓度虽较低（共约 3.2mmolL^{-1}，其中 25% 为谷氨酰胺），但每日 400g 蛋白质的转换却与吸收自血液并又释回血液的蛋白质量是相当的，即 4.6mol 的 α－氨基－N，因此，血浆中氨基酸的平均寿命约为 5min。血浆游离氨基酸被转换的速度与血浆葡萄糖或血浆游离脂肪酸的相同。如同血糖一样，血浆氨基酸的浓度是相当恒定的，但目前尚不清楚此恒定状态是如何维持的。

葡萄糖以求生存时，该磷酸化调节作用便压倒一切，成为最首要的机制。

饥饿状态下，肾脏以能够衍生出谷氨酸的谷氨酰胺作为氨的来源，氨可中和分泌出的酮体。部分氨进入肝脏参与尿素的生成。而碳骨架，2 -酮戊二酸则用于糖异生途径。无论是在正常情况下还是在饥饿状态下，肠道都会优先代谢谷氨酰胺、谷氨酸、天冬氨酸及天冬酰胺。由于肠细胞的脱落，肠道细胞的分裂较快，谷氨酰胺作为氮源用于合成嘌呤。部分谷氨酰胺可被用于合成瓜氨酸（瓜氨酸于肾脏内可被转化为精氨酸，进而肝脏利用精氨酸合成尿素），剩余的谷氨酰胺则被转化为丙氨酸而进入门静脉。图 15 - 12 总括了上述组织中氨基酸的代谢，及肝内尿素合成的氮源。

15.5　多余氮的处理

问题：氮为何被排出？

与脂质和糖原相比较，机体内无氮的贮存；即任何超出生长需求的氮都将被排出体外。若摄入的氮少于正常生长及组织修复所需要的氮，机体则会调动肌肉蛋白中的氮。

超出代谢需求的氨基酸将被降解为其相应的碳骨架，已于前一部分讨论过，从而进入能量代谢或被转化为其他化合物与氨；氨被排出或被转化为尿素后再排出。上述代谢情况适合于人类，但对其他物种则有不同的途径排去多余的氮。

对于水生动物，可通过皮肤将多余的氨散出体外，而陆生动物则以尿素或尿酸的形式排出余氨。人类在进食了富含肉类的饮食后，氨会被排出以保存下 Na^+ 和 K^+。由磷蛋白与含 S 氨基酸产生的过量的 PO_4^{3-} 和 SO_4^{2-} 以铵盐的形式被排出；Na^+ 和 K^+ 则在肾脏内被交换为 NH_4^+。尿素的排出过程需要大量的水，因其通常以溶液的形式排出，而尿酸则是不溶的，鸟类与爬行动物以固体形式排出尿酸。故对于要保持体重，或水储存很重要的动物，是以尿酸形式排出余氮的。

尿素，NH_2CONH_2，水溶性很好（$10molL^{-1}$），无毒，富含氮（47%）。若摄食西餐，正常人每日会排出约 30g 的尿素，若摄入高蛋白饮食，则会增加至 100g。人类及其他灵长目动物，可排出少量的作为嘌呤代谢终产物的尿酸。因此，我们能够以氨、尿素与尿酸的形式排出多余的氮。也可以另外几种含氮代谢物，如胆色素的形式将氮排出体外。这些含氮化合物是血红蛋白及其他含卟啉分子的降解产物。

氨的形成

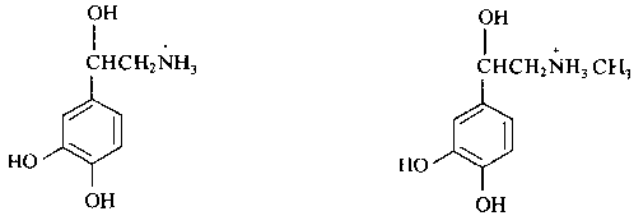
肝、脑、肌肉及肾脏内参与氨形成的主要的酶是谷氨酸脱氢酶，可催化氨与 2 -酮戊二酸缩合生成谷氨酸的反应（见 15.1）。少量的氨可来自于重要的胺代谢物，如肾上腺素、去甲肾上腺素与组胺经胺氧化酶催化产生氨。也可来自于嘌呤与嘧啶的降解（见 15.6），在小肠内则可来自于谷氨酸的水解。氨的浓度被限制在很窄的范围内，人体血液中正常的上限值约为 $70\mu molL^{-1}$。在极低浓度情况下对多数细胞有害；因而氨的去除需要特异的化学机制。目前，对于氨产生毒性的机制尚不清楚。肝脏内的尿素循环使外周血中氨的浓度保持在约 $20\mu molL^{-1}$。

组织中，氨与铵离子是平衡的：

$$NH_3 + H^+ \rightleftharpoons NH_4^+$$

在 7.2 的生理 pH 条件下，99%的氨以离子形式存在。当载体介导的铵离子的转运过程缓慢时，非离子化的氨便会扩散穿入细胞膜。

可以看出，肝外组织代谢而来的氨中有相当部分在肝内被转化为尿素，只有很少的部分



(a) 去甲肾上腺素　　(b) 肾上腺素

图 15－11　去甲肾上腺素与肾上腺素的结构

饥饿状态下，氨基酸的分解代谢是非常重要的，因主要组织中氨基酸的分解代谢可以反映这些组织的功能状态。由于肌肉的量较多，因此，饥饿时肌肉中氨基酸的分解代谢极为重要，可为肝脏提供糖异生作用的前体化合物。饥饿时由蛋白质水解而产生的氨基酸可在肌肉组织中互换，脱离肌肉组织的氨基酸中 60% 是谷氨酰胺或丙氨酸。支链氨基酸，缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸均为必需氨基酸，在肌肉组织中经特异的转氨酶的作用而脱去氨基，并且产生的 2－酮酸被转运至肝脏通过支链 2－酮酸脱氢酶（BCOADH）的作用而被进一步代谢。肝脏内转氨酶是无活性的，以便肝脏能够向周围组织提供缬氨酸、亮氨酸与异亮氨酸。多数情况下，BCOADH 的活性是受磷酸化作用（磷酸化导致此酶失活）调节的，相应于机体对支链氨基酸的需求，活化的 BCOADH 可使三种支链氨基酸氧化脱羧，其氧化脱羧反应与丙酮酸脱氢酶复合体催化的丙酮酸转化为 CoA 衍生物的过程相似。饥饿状态下，当机体需要

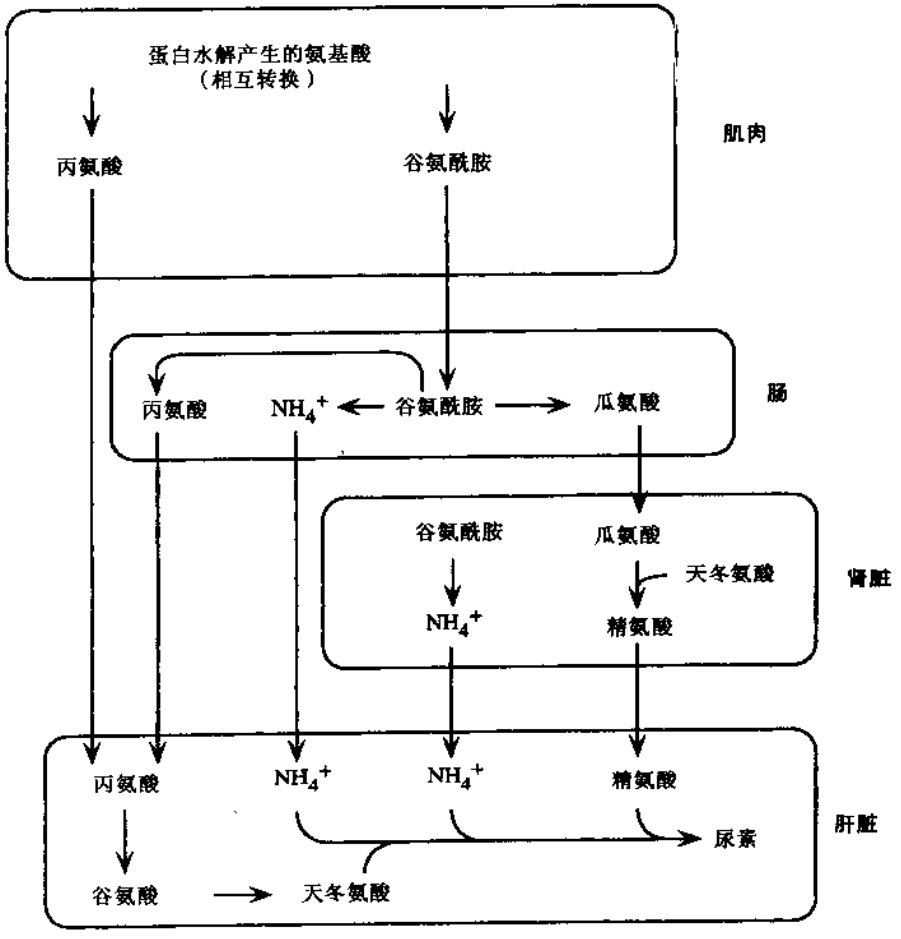


图 15－12　氨基酸的氮组分由组织转至肝脏合成尿素

仅见于某些蛋白如角蛋白中精氨酸残基的翻译后修饰。瓜氨酸脱离线粒体的途径与鸟氨酸自细胞质进入线粒体的转运系统相同。

例 15.10

瓜氨酸因于 1930 年首次发现于西瓜属植物中而得名。同年又发现它是细菌精氨酸的降解产物。发现尿素循环的 Krebs 证实瓜氨酸是介于鸟氨酸与精氨酸之间的中间化合物。尿素循环是被发现的第一个代谢循环。Krebs 将其描述成“揭示了代谢过程的结构新模式”。

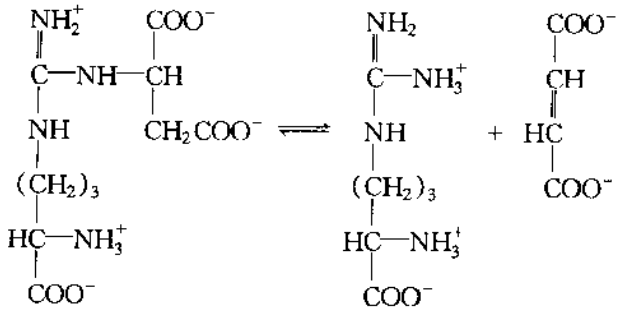
精氨基琥珀酸合成酶

精氨基琥珀酸合成酶（尿素循环中的第二个酶）与参与循环的另外两个酶存在于细胞质中。精氨基琥珀酸合成酶催化瓜氨酸与天冬氨酸缩合形成精氨基琥珀酸。反应需要 1 分子 ATP 的参与，ATP 被水解为 AMP 和 PPi。焦磷酸是该反应的强抑制剂（$K_i = 6.2 \times 10^{-5}\text{molL}^{-1}$）；但通常因焦磷酸酶将其水解而并不起抑制作用。

$$\text{瓜氨酸} + \text{天冬氨酸} + \text{ATP} \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} \text{精氨基琥珀酸} + \text{AMP} + \text{PPi}$$

精氨基琥珀酸裂解酶

精氨基琥珀酸裂解酶（参与尿素循环的第三个酶）可逆地催化精氨基琥珀酸裂解为精氨酸与延胡索酸的反应。



精氨基琥珀酸　　精氨酸　　延胡索酸

此反应可为蛋白质的合成提供精氨酸。循环中脱去的精氨酸必须得到补充，可通过由谷氨酸合成鸟氨酸来补充。另一个反应产物延胡索酸的去向则依赖于糖异生途径对其的需求状况。若机体需要葡萄糖，那么，延胡索酸经细胞质中延胡索酸酶和苹果酸脱氢酶的作用而被转化为草酰乙酸，进而再被转化为磷酸烯醇式丙酮酸与葡萄糖。若糖异生途径不需要延胡索酸，它将被转化为草酰乙酸，并经天冬氨酸氨基转移酶的转氨基作用而脱去氨基为下一轮尿素循环提供天冬氨酸。

精氨酸酶

精氨酸酶，是尿素循环中的第四个酶，催化精氨酸水解为尿素和鸟氨酸。

$$\text{精氨酸} + H_2O \rightarrow \text{尿素} + \text{鸟氨酸}$$

尿素经转运蛋白的运载而进入血液，随血液流至肾脏，再经肾小球滤过被排入尿中。

尿素循环的各反应如图 15－13 所示。

尿素循环的总反应式为：

$$3\text{ATP} + NH_4^+ + CO_2 + 2H_2O + \text{天冬氨酸} \rightarrow 2\text{ADP} + 4\text{Pi} + \text{AMP} + \text{延胡索酸} + \text{尿素}$$

由于自 AMP 再生成 ATP，需要 1 分子 ATP 转化为 AMP 和 ADP（此反应由腺苷酸激酶催化），因而每分子尿素的合成中有 4 分子 ATP 被水解。

以氨的形式残留在组织内。尤其是小肠吸收细胞，将氨释入门静脉；在门静脉处氨的浓度可高达 0.26mmolL^{-1}，因 30%的尿素是在肝脏内合成的。图 15－12 是含氮化合物流向尿素合成场所肝脏的示意图。

尿素合成

尿素是在肝脏内通过一系列被称为尿素循环（图 15－13）的反应而合成的。其中一个氮由氨衍生，另一个来源于天冬氨酸；而碳则是由 CO_2 衍生而来的。尿素的合成包括氨甲酰磷酸的生成与尿素循环中的四个酶促反应。一部分反应在线粒体内进行，一部分则在细胞质中进行。下面将讨论参与尿素合成的酶。

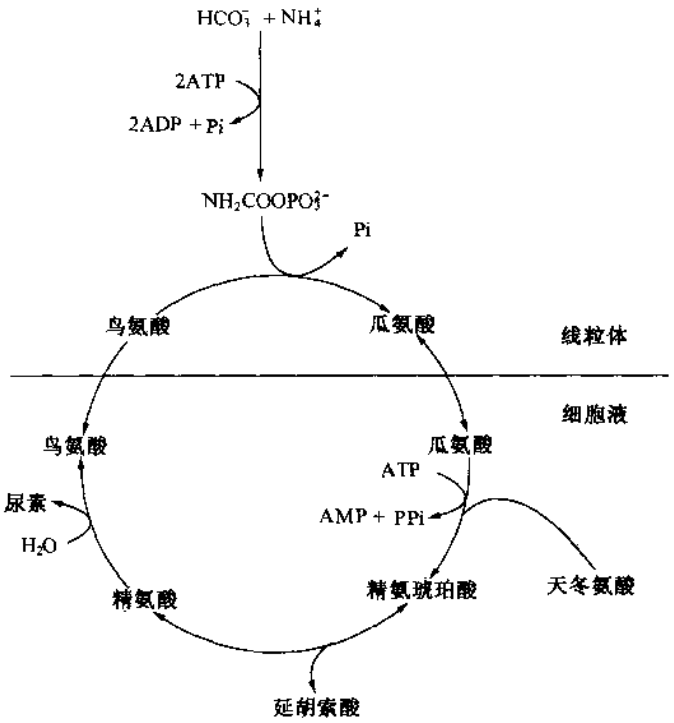


图 15－13　尿素循环

氨甲酰磷酸合成酶Ⅰ

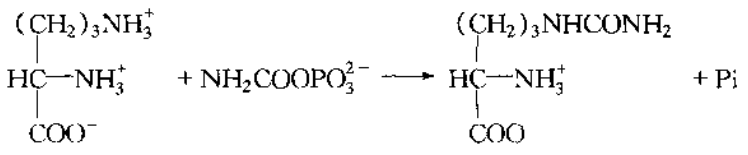
氨甲酰磷酸（$NH_2COOPO_3^{2-}$）的形成是在线粒体基质中进行的：

$$NH_4^+ + HCO_3^- + 2ATP \rightarrow NH_2COOPO_3^{2-} + 2ADP + Pi$$

其中，铵离子可来源于由谷氨酸脱氢酶催化的谷氨酸脱氢反应，或来源于血液中游离的铵离子，HCO_3^- 则来自于呼吸过程。

鸟氨酸氨甲酰转移酶

尿素循环的第一个反应发生在线粒体基质中，由鸟氨酸氨甲酰转移酶催化。



L－鸟氨酸　　氨甲酰磷酸　　瓜氨酸

鸟氨酸是赖氨酸的同系物，鸟氨酸与瓜氨酸都是 L－氨基酸，二者都不含遗传密码子，

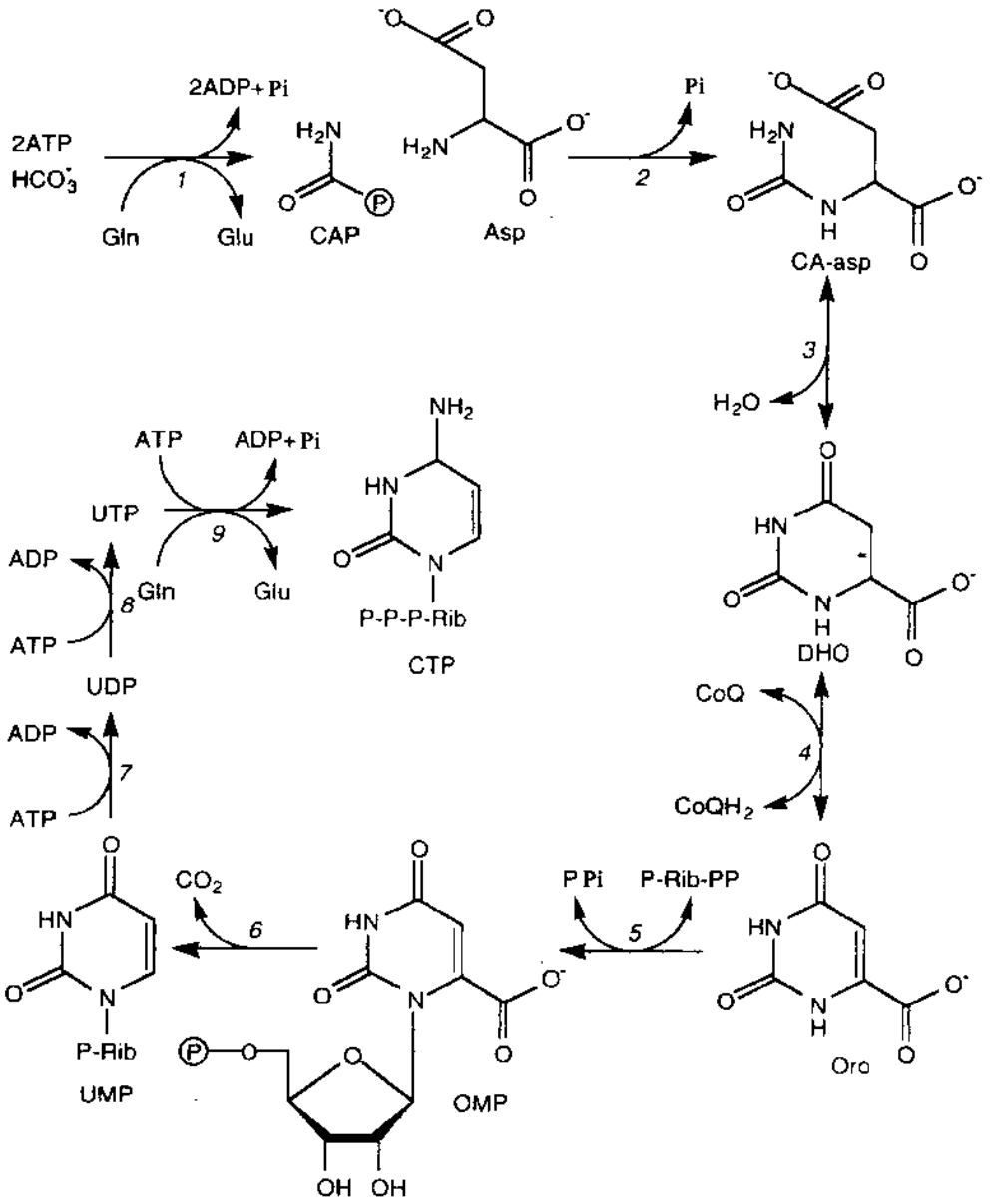


图 15－15　嘧啶的从头生物合成途径。CAP，氨甲酰磷酸；CA-asp，*N*－氨甲酰－L－天冬氨酸；DHO，L－二氢乳清酸；Oro，乳清酸；OMP，5′－磷酸乳清酸核苷；催化反应的酶为：1. 氨甲酰磷酸合成酶 II；2. 天冬氨酸氨甲酰转移酶；3. 二氢乳清酸酶；4. 二氢乳清酸脱氢酶；5. 乳清酸磷酸核糖转移酶；6. OMP 脱羧酶；7. 核苷一磷酸激酶；8. 核苷二磷酸激酶；9. CTP 合成酶

sel)。在适当的条件下（如高氨血症），由 CPSase I 催化的于线粒体基质内合成的氨甲酰磷酸可进入胞质中参与嘧啶的生物合成。

例 15.11

细菌如*E. coli* 中，嘧啶从头生物合成途径（见图 15－15）的前六个反应是由六个不同的酶催化的，但在高等动物中，反应 1、2 和 3 却是由一个三功能酶所催化的，反应 5 和 6 是由一个双功能酶催化的。那么，如此将不同的活性位点联合于同一酶中有何优越性？

反应 1 的产物氨甲酰磷酸（CAP）对二氢乳清酸合成酶极不稳定，并迅速被比氨甲酰磷酸合成酶活性高 50 倍（对于每一活性位点）的天冬氨酸氨甲酰转移酶所转化。高水平的氨

问题：尿素循环为何是分室进行的？

主要原因可能是为了保持系统内的低延胡索酸浓度，因为延胡索酸（与精氨酸）可抑制精氨基琥珀酸裂解酶的活性。而此酶存在于细胞质中；因而不会被柠檬酸循环中高浓度的延胡索酸所抑制，因该延胡索酸在线粒体内。

15.6 嘧啶与嘌呤代谢

核苷酸的合成极为重要，不仅仅因为核酸在蛋白质合成及遗传信息的储存方面有至关重要的作用，还因为核苷酸如FAD、NAD(P)H、CoASH、cAMP与UDP-葡萄糖在代谢中也有作用。

嘧啶核苷酸的生物合成

嘧啶环是由氨甲酰磷酸和天冬氨酸衍生而来的，如图15-14所示。图15-15示意了嘧啶核苷酸的从头合成途径。形成第一个完整嘧啶环的化合物是二氢乳清酸。其被氧化为乳清酸后才可连接上核糖，产生乳清核苷酸。化合物5-磷酸核糖-1-焦磷酸（P-Rib-PP）提供了磷酸核糖。在分别由氨甲酰磷酸合成酶II与CTP合成酶催化的反应1和9中，L-谷氨酰胺作为提供氮原子的底物；第二个氨基酸，L-天冬氨酸是由天冬氨酸氨甲酰转移酶催化的反应2的底物。P-Rib-PP是氨甲酰磷酸合成酶II的激活剂，也是由乳清酸磷酸核糖转移酶催化的反应5的底物。

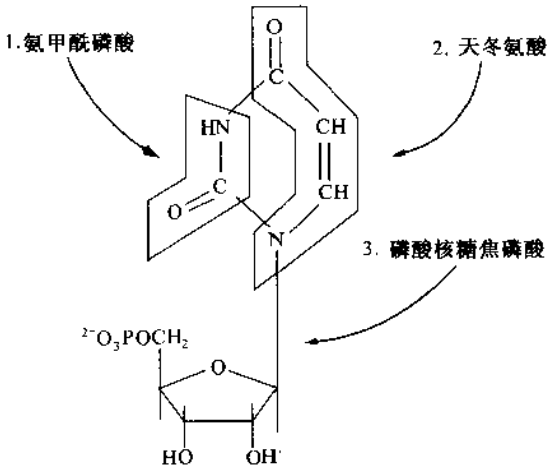


图15-14 尿嘧啶核苷酸的组成成分

嘧啶合成途径能够中的终产物UTP是氨甲酰磷酸合成酶II的有效抑制剂，而其底物和ATP则可激活此酶。相对于合成途径（图15-15）中催化后续反应的酶，氨甲酰磷酸合成酶II的活性较低，在正常条件下，从头合成途径中的通量受胞内P-Rib-PP、UTP和ATP水平的调节；即氨甲酰磷酸合成酶II催化合成途径中的通量控制步骤（见10.5）。

嘧啶核苷酸的从头生物合成途径中有两个多功能蛋白。一个是称为二氢乳清酸合成酶（CAD，三个酶促反应的第一个字母的组合）的三功能蛋白，能够催化合成途径中的反应1、2和3（HCO_3^- → CAP → CA-asp → DHO；见图15-15）。氨甲酰磷酸合成酶、天冬氨酸氨甲酰转移酶与二氢乳清酸酶的活性包含于分子量为243kDa的多肽单链的独立的球形结构域中，此结构域可与易被蛋白酶如胰蛋白酶水解消化的多肽链片段共价结合。另一个是双功能酶，UMP合成酶，可催化嘧啶合成途径中的反应5和6（乳清酸→OMP→UMP；见图15-15）。两个酶，乳清酸磷酸核糖转移酶和OMP脱羧酶，包含于分子质量为51.5kDa的二聚体蛋白中。

二氢乳清酸脱氢酶，是催化二氢乳清酸脱氢为乳清酸（合成途径中的反应4；见图15-15）的酶，存在于线粒体内膜的外侧。此酶以FAD为辅基，并在哺乳动物的电子传递中被转移给泛醌。嘧啶从头合成途径是分室进行的；由三功能的DHO合成酶于细胞质中合成的二氢乳清酸必须穿入线粒体外膜，被氧化为乳清酸，再穿回细胞质中，成为双功能UMP合成酶的底物。哺乳动物细胞包含两种氨甲酰磷酸合成酶：为CAD一部分的谷氨酰胺依赖的酶（CPSaseII），及存在于线粒体基质中的被用于合成尿素与精氨酸的氨依赖的酶（CPSa-

嘌呤核苷酸的生物合成

嘌呤环的合成要比嘧啶环的合成复杂。自 P-Rib-PP 起，肌苷酸（IMP）的形成需经过 10 个步骤（图 15－16）。总反应为：

$$\text{P-Rib-PP} + 2\text{Gln} + 2\text{Gly} + 2,10\text{-甲酰-THF} + HCO_3^- + \text{Asp} + 4\text{ATP}$$
$$\rightarrow \text{IMP} + 2\text{Glu} + 2\text{THF} + \text{延胡索酸} + 4\text{ADP} + \text{PPi}$$

嘌呤核苷酸从头生物合成途径的详细过程如图 15－16 所示。分别由酰氨基磷酸核糖转移酶、FGAM 合成酶与 GMP 合成酶催化的反应 1、4 及 14 的底物是 L－谷氨酰胺，L－谷氨酰胺为上述反应提供了氮原子。甘氨酸是反应 2 的底物，L－天冬氨酸是反应 7 与 11 的底物。P-Rib-PP 是酰氨基磷酸核糖转移酶的底物和活化剂，此酶可被 AMP、IMP、GMP 及二氢叶酸的聚谷氨酰胺衍生物所抑制。

酰氨基磷酸核糖转移酶（P-Rib-PP→PRA）的活性较低，其在体内嘌呤核苷酸从头合成途径中的量受反应终产物 AMP、IMP 及 GMP 的调控。反应 1 被二氢叶酸聚谷氨酰胺抑制后即相当于发出了缺乏 N^{10}-甲酰四氢叶酸的信号，而 N^{10}-甲酰四氢叶酸是合成途径中反应 3 和 9 的底物。嘌呤合成途径在分支点 IMP 处受到进一步调节；XMP 是 IMP 环水解酶（FAICAR→IMP）的有效抑制剂，AMP 可抑制腺苷酸琥珀酸合成酶（IMP→sAMP），GMP 抑制 IMP 脱氢酶（IMP→XMP）。

合成途径中有四种多功能酶：一个是包含 GAR 合成酶、GAR 转甲酰酶和 AIR 合成酶的三功能酶，此三种酶分别催化反应 2、3 和 5（PRA→GAR→FGAR，FGAM→AIR；见图 15－16）。以糜蛋白酶消化处理此三功能酶即可将 GAR 合成酶与 GAR 转甲酰酶的结构域分开。

另一个是包含 AIR 羧化酶和 SAICAR 合成酶的双功能酶，该两种酶分别催化嘌呤合成途径的反应 6 和 7（AIR→CAIR→SAICAR；见图 15－16）。第二个多功能酶是 IMP 合成酶，其中包含分别催化反应 9 和 10 的 AICAR 转甲酰酶和 IMP 环水解酶（AICAR→FAICAR→IMP；见图 15－16）。人类的 IMP 合成酶含有一个分子质量为 62.1kDa 的亚基，两个亚基聚合为二聚体。另一个三功能酶，C_1-THF 合成酶，包含 N^5, N^{10}-亚甲四氢叶酸（5, 10 -CH_2-THF）脱氢酶、N^5, N^{10}-甲川四氢叶酸（5, 10 -CH-THF）环水解酶和 N^{10}-甲酰四氢叶酸（10-CHO-THF）合成酶，此三种酶分别催化反应 5, 10 -CH_2-THF → 5, 10 -CH-THF → 10-CHO-THF，和 THF→10-CHO-THF。产生的 N^{10}-甲酰四氢叶酸是催化反应 3 和 9 的 GAR 与 AICAR 转甲酰酶的底物（图 15－16）。高等真核生物中，脱氢酶与环水解酶活性位点位于蛋白的同一结构域内，此结构域融合于一个大的合成酶的结构域中，形成三功能酶。

第五个双功能酶，腺苷酸琥珀酸裂解酶催化嘌呤合成途径中的反应 8 和 12（图 15－16），它只有一个活性位点，却有双重特异性，能够催化两个反应（SAICAR→AICAR，sAMP→AMP；见图 15－16）。图 15－16 所示的所有 14 种酶都存在于细胞质中，并有证据显示体内有这些酶的亚型缔合体。有人提出，对于完整细胞内进行的嘌呤的从头生物合成，存在“途径颗粒”或“代谢区室”现象。

例 15.12

有些迹象显示，对于有 14 种酶参与的嘌呤的生物合成途径（图 15－16），及另 4 种酶参与的 N^{10}-甲酰四氢叶酸的合成，有“代谢区室”存在。

进化过程中酶催化位缔合的优越性可能有：

(a) 不稳定中间化合物通路，如在扩散出代谢区室之前合成途径中相邻酶之间的磷酸核糖胺（PRA）；

(b) 结合在单一调节位的效应剂可引起代谢区室内多种酶的协同调节；

(c) 表达于单一蛋白内的多个酶活的同步表达，在任何生长条件下各个酶的催化活性都保持恒定的比率（如二氢乳清酸合成酶）。

甲酰天冬氨酸（CA-asp）有毒性，但此中间体可被高活性的二氢乳清酸酶所消耗。因前三个反应是由单一的多功能蛋白催化的，在生长条件下，这三个酶的活性位以恒定的比率表达，以保持低水平的 CAP 和 CA-asp。对于 UMP 合成酶，其中的 OMP 脱羧酶的活性（每一活性位点）远远高于乳清酸磷酸核糖转移酶，使得胞内 OMP 中间体的水平较低，（高等动物细胞内的）OMP 亦可进行其他的酶解反应。

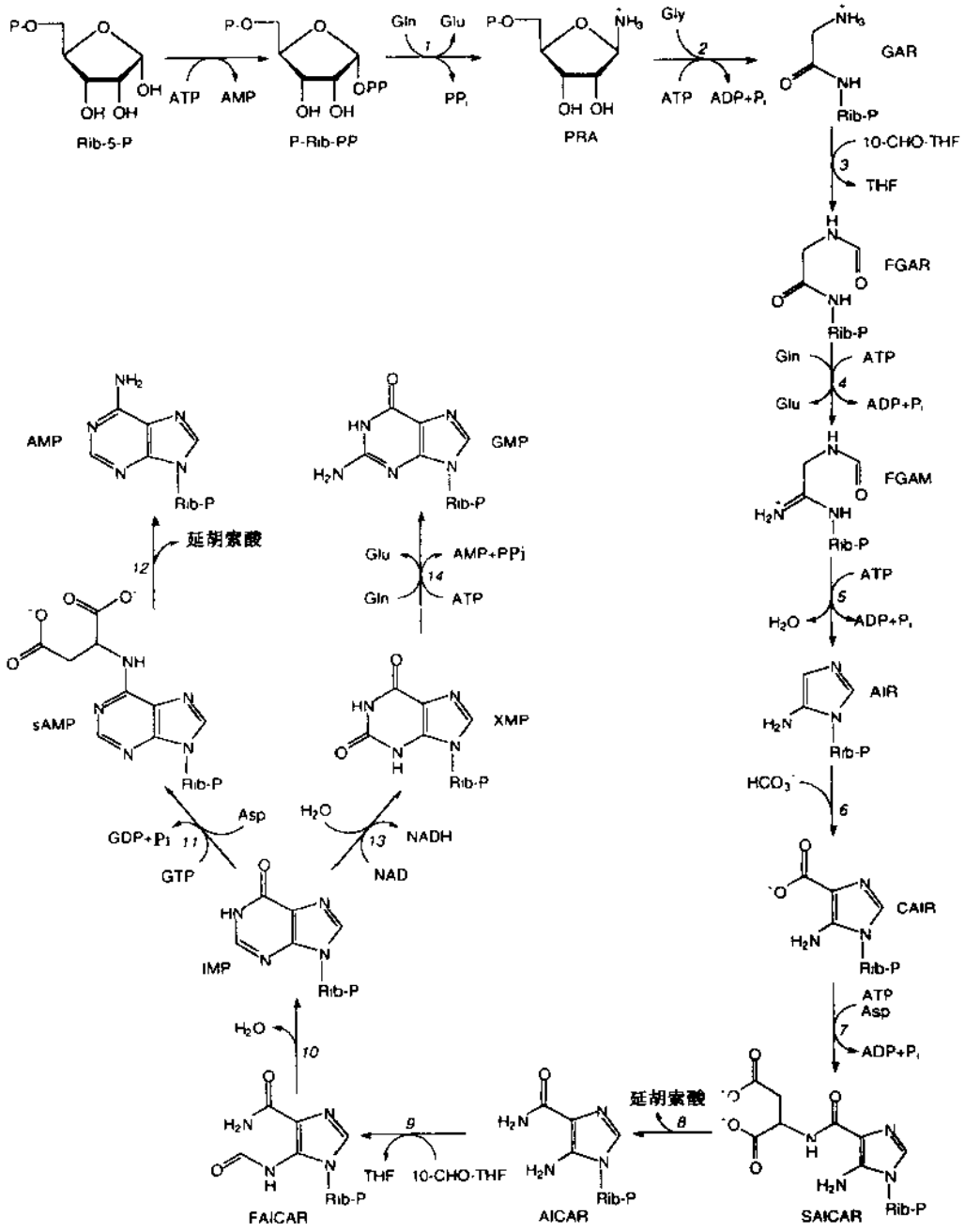


图 15－16　嘌呤的从头生物合成途径。Rib-5-P, 5－磷酸核糖；P-Rib-PP, 5－磷酸核糖 1－焦磷酸；PRA, 5－磷酸核糖胺；10-CHO-FH_4, N^{10}－甲酰四氢叶酸；GAR, 甘氨酰胺核苷酸；FGAR, N－甲酰甘氨酰胺核苷酸；FGAM, N－甲酰甘氨脒核苷酸；AIR, 5－氨基咪唑核苷酸；CAIR, 4－羧基－5－氨基咪唑核苷酸；SAICAR, N－琥珀酸－5－氨基咪唑－4－甲酰胺核苷酸；AICAR, 5－氨基咪唑－4－甲酰胺核苷酸；FAICAR, 5－甲酰胺－4－氨甲酰咪唑核苷酸；sAMP, N－琥珀酸－AMP。酶：1. 酰氨磷酸核糖转移酶；2. GAR 合成酶；3. GAR 转甲酰酶；4. FGAM 合成酶；5. AIR 合成酶；6. AIR 羧化酶；7. SAICAR 合成酶；8. 腺苷酸琥珀酸酶；9. AICAR 转甲酰酶；10. IMP 环水解酶；11. sAMP 合成酶；12. 腺苷酸琥珀酸酶；13. IMP 脱氢酶；14. GMP 合成酶

核苷酸结抗物作为抗癌药物

为了生长与分裂，癌细胞必须能够复制由 5′-磷酸脱氧核苷特异聚合而组成的染色体。癌细胞与体内正常细胞的不同之处在于其生长迅速和（或）连续不断地循环与分裂。核苷酸合成的抑制剂对癌细胞有选择性毒性，因其可引起胞内 DNA 合成所需的 dNTP 缺失或失衡，而癌细胞内 DNA 的合成比正常细胞更显著。以药物（如 5-氟尿嘧啶）处理癌细胞引起的四种 dNTP 中某一种（如 dTTP）的选择性缺失可抑制癌细胞内 DNA 的合成，随之细胞死亡。若并不缺乏 dTTP，而是 dTTP 的量减少，那么，胞内 dNTP 池的失衡则会导致遗传密码编码错误，继而产生致命突变体。

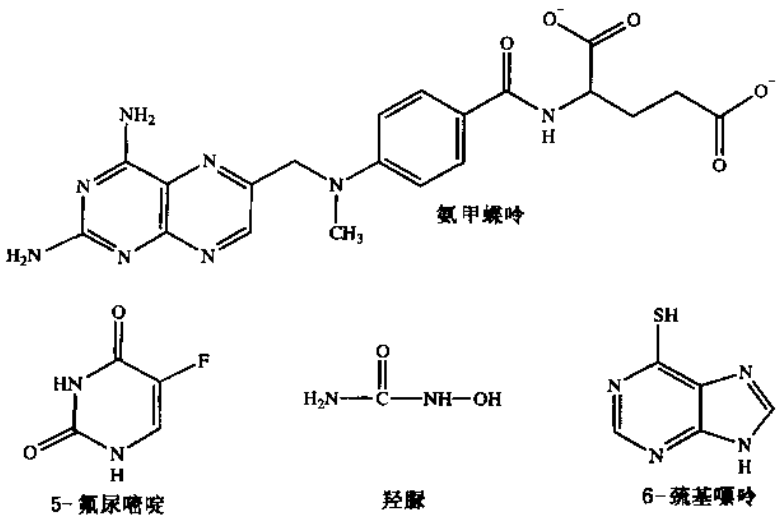


图 15-17　可抑制核苷酸生物合成的四种抗癌药物的化学结构

四种常用抗癌药物的化学结构如图 15-17 所示。氨甲蝶呤是于 1949 年合成的第一个“真正”的抗癌药物，自 20 世纪 50 年代早期就已用于临床治疗各种癌症。氨甲蝶呤是二氢叶酸还原酶的有效抑制剂，其与酶反应的抑制常数为 10^{-9}mol/L。胞内二氢叶酸还原酶被抑制后，导致二氢叶酸大量蓄积，可达 2.5μmol/L，四氢叶酸量则减少。由于经氨甲蝶呤处理的细胞释出了一定量的四氢叶酸，因而上述抑制后，THF 量的减少并不显著。高水平的 DHF 对细胞有毒性，阻断胸苷酸合成酶催化的反应，

$$dUMP + 5,10\text{-}CH_2\text{-}THF \rightarrow dTMP + DHF$$

与酰氨 PRTase 催化的嘌呤从头生物合成的第一个反应

$$P\text{-}Rib\text{-}PP + L\text{-}谷氨酰胺 \rightarrow PRA + L\text{-}谷氨酸 + PPi$$

以氨甲蝶呤处理的白血病细胞中，dTTP 水平降低，也可能会有因酰氨 PRTase 的受抑制而引起的 dATP 与 dGTP 水平的明显下降。继而，核苷酸池的失衡导致遗传密码错编，细胞死亡。

例 15.15

氨甲蝶呤是一种具有“结合化学疗法”主要特性的抗癌药物。现已证实，癌细胞可通过多种机制对氨甲蝶呤产生抗性。

(a) 编码靶酶，二氢叶酸还原酶的基因扩增。

(b) 转运氨甲蝶呤进入细胞的叶酸载体突变。

(c) 二氢叶酸还原酶突变，使此酶与底物二氢叶酸结合，而与氨甲蝶呤的结合较弱。

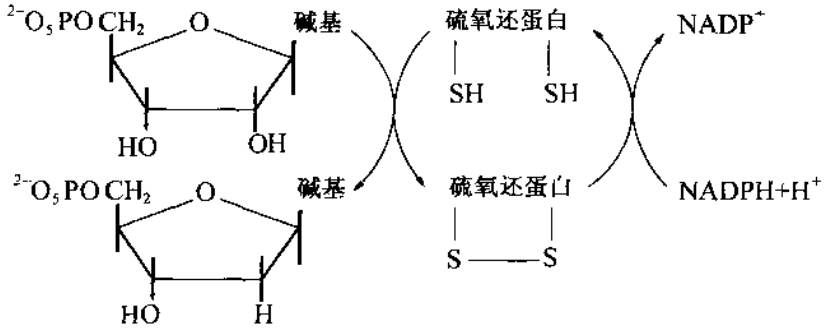
(d) 叶酰聚谷氨酰合成酶失活；此酶可在氨甲蝶呤结构上添加一个聚谷氨酰基之尾，以使其能够保留在癌细胞内。

脱氧核糖核苷酸的合成

DNA 的合成依赖于脱氧核糖核苷酸的供给。反应底物为二磷酸核糖核苷 ADP、GDP、CDP 和 UDP；将这些底物还原为相应脱氧衍生物的酶是以硫氧还蛋白为共底物的核糖核苷酸还原酶。

例 15.13

硫氧还蛋白是分子质量为 12 000Da 的蛋白质，可通过将两个半胱氨酸氧化为胱氨酸而提供两个电子；氧化形的硫氧还蛋白可被 NADPH 还原：



例如，二磷酸脱氧腺苷（dADP）的合成总反应式为

$$ADP + NADPH + H^+ \rightarrow dADP + NADP^+ + H_2O$$

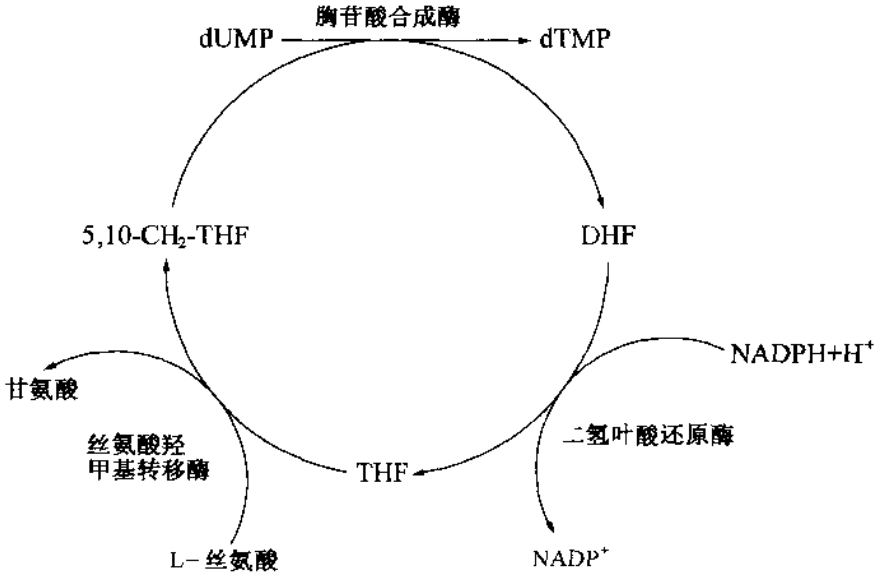
二磷酸脱氧核苷可被 ATP 所磷酸化。

例 15.14

为确保产生的几种脱氧核糖核苷酸比例适当，核糖核苷酸还原酶是如何受到调节的？

核糖核苷酸还原酶包含两个催化位点、两个调节位点和两个专一性位点。催化位点结合底物，硫氧还蛋白（被 NADPH + H^+还原）与核苷二磷酸。ATP 作为激活剂与作为抑制剂的 dCTP 竞争与变构调节位点的结合。专一性位点可结合 dGTP、dTTP 和 dATP，不能结合 dCTP，此位点能够调节核糖核苷酸还原酶对四种 NDP 底物的选择性活性以使四种 dNTP 池保持平衡。

合成 DNA 的细胞也必须能够合成三磷酸脱氧胸腺嘧啶（dTTP）。dTTP 合成的关键是在胸苷酸合成酶的作用下 dUMP 转化为 dTMP 的过程。此反应需要 N^5，N^{10}-亚甲四氢叶酸（见 15.7，图 15－19）提供甲基。四氢叶酸被氧化为二氢叶酸。二氢叶酸须在二氢叶酸还原酶的作用下被还原为四氢叶酸，才能使丝氨酸羟甲基转移酶催化的反应不断由丝氨酸产生 N^5, N^{10}-亚甲四氢叶酸。dTMP 生成过程中的三个基本反应如下所示。



循环的尿苷而合成嘧啶核苷酸（UTP 和 CTP）。人体细胞至少包含三种类型非特异的核苷转运体，核苷的内在化比核碱基要快得多。

在胞内，一旦核苷被转化为相应的 NMP，腺苷由腺苷激酶催化，尿苷则由尿苷激酶催化：

$$\text{核苷} + \text{ATP} \rightarrow \text{NMP} + \text{ADP}$$

那么，无论是由 PRTase 还是激酶催化的反应而补救的 NMP 将被转化为 5′-三磷酸核苷（NTP）：

$$\text{NMP} \rightarrow \text{NDP} \rightarrow \text{NTP}$$

例 15.16

患某些疾病时，体内会产生过量的嘌呤，导致尿酸蓄积。莱施-尼罕综合症患者缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HG-PRTase）。先天性此疾患的儿童智力迟钝并有自残倾向。病儿体内因产生过量嘌呤而引起 P-Rib-PP 的积聚，P-Rib-PP 又可刺激合成途径中第一个酶，酰氨 PRTase 的活性（图 15－16）。过剩的嘌呤经下列反应而降解

$$\text{腺苷} \rightarrow \text{肌苷} \rightarrow \text{次黄嘌呤} \rightarrow \text{黄嘌呤} \rightarrow \text{尿酸}$$

莱施-尼罕综合症患者也可能患有痛风，因体内尿酸的蓄积而引起尿酸钠晶体于肾脏和关节部位沉积。然而，痛风一般是因肾脏不分泌尿酸而造成的，或者是由其他因素并非 PRTase 缺乏引起的 P-Rib-PP 的蓄积而造成的。

核酸降解

核酸的降解过程与蛋白质的降解过程有很多相似之处。膳食和内源性核酸的水解都可产生核苷酸。内源性（胞内）的多核苷酸可被溶酶体所分解。正常情况下，DNA 不能被快速转换，除非是细胞死亡或在 DNA 修复过程中。RNA 则能够以与蛋白质相似的途径被转换。核酸酶有两种；脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶，可分别水解 DNA 与 RNA 成为能被进一步水解的寡核苷酸（图 15－18），最终形成嘌呤和嘧啶。

大部分能够水解膳食 DNA 和 RNA 的酶于消化道内被分泌出。因此，小肠肠腔内有核糖核酸酶存在，而磷酸二酯酶与核苷酸酶则出现于粘膜细胞内。

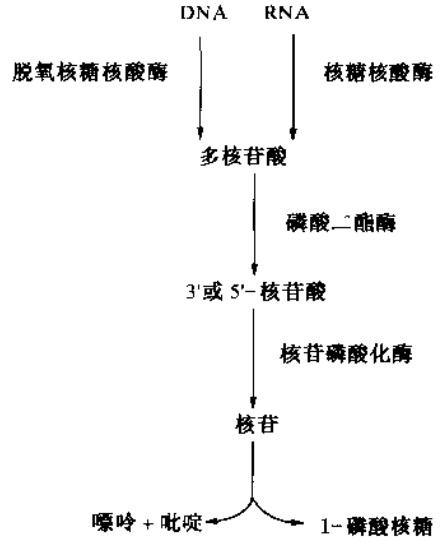


图 15－18　DNA 和 RNA 水解为嘌呤与嘧啶

嘌呤与嘧啶的降解

超出胞内需求的嘌呤和嘧啶可被降解。降解程度因物种的不同而有所区别。人类因缺少尿酸酶而不能将嘌呤降解为尿酸，尿酸酶可打开嘌呤环生成尿囊素。经特异脱氨酶的作用，

在被给予单一药物治疗（氨甲蝶呤）的癌症患者体内可发现氨甲蝶呤抗性细胞，但在抗药性癌症复发后症状会逐渐消失。

5-氟尿嘧啶也是一种非常有效的抗癌药物，其被细胞吸收与代谢的过程如下：

FU → FUMP → FUDP → FUTP
↓
FdUDP → FdUTP
↓
FdUMP

FU作用的基本机制是通过5-氟脱氧UMP（FdUMP）抑制胸苷酸合成酶（dUMP→dTMP）的活性。FdUMP结合到带有另一底物5,10-CH_2-THF的腺苷酸合成酶上，生成紧密的三元络合物。处于酶活性位点的半胱氨酸残基攻击其自然底物，dUMP，形成过度共价键。但此键因FdUMP嘧啶环（图15-17）上5-氟基团的存在而不能断裂。故，胸苷酸合成酶因此致命抑制剂而永久失活，随之胞内dTMP、dTTP耗尽。5-氟尿嘧啶也可通过另外两种机制杀灭癌细胞。胞内蓄积的FUTP能够整合到RNA上，导致遗传密码错编，或FdUTP整合到DNA上，亦可引起致命突变。

羟基脲是可抑制核糖核苷酸还原酶活性的一类简单化合物（图15-17）。此酶可接纳四种底物NDPs，即UDP、CDP、ADP和GDP，并将它们还原为相应的dNDP。催化过程包括非正常的酪氨酰阳离子自由基的形成与随后引发的NDP底物自由基的形成。羟基脲猝灭了酪氨酰阳离子自由基，导致作为DNA合成底物的四种dNTP耗尽。

6-巯基嘌呤（图15-17）是诺贝尔奖获得者Gertrude Elion和George Hitchings发现的多种药物中的一种。五十年代早期就已被合成，并作为有效的抗癌药物。与5-氟尿嘧啶相似，6-巯基嘌呤也有多种依赖于细胞类型不同而不同的毒性机制。6-巯基嘌呤可进入细胞内，其代谢途径如下：

MP → MP-MP → MP-DP → MP-TP
↓
MXMP
↓
MGMP → MGDP
↓
MdGDP → MdGTP

此途径中生成的6-巯基嘌呤5′-磷酸（MP-MP）是酰氨PRTase的有效抑制剂，因而，嘌呤的从头生物合成（图15-16）被阻断。6-巯基嘌呤也可整合入DNA，引起遗传密码错编。

核苷酸的补救合成

嘧啶与嘌呤，尤其是嘌呤的从头合成，是相当耗能的，因此，由核酸的降解，特别是RNA的降解而产生的嘌呤和嘧啶的大部分（80%）将被再利用。人体细胞包含三种磷酸核糖转移酶（PRTsae），分别为腺嘌呤-、次黄嘌呤-鸟嘌呤-和乳清酸-（尿嘧啶）PRTase；此三种酶可将予成的核碱基转化为等量的5′-磷酸核苷酸（NMP）：

核碱基 + P-Rib-PP → NMP + PPi

P-Rib-PP是5-磷酸核糖（Rib-5-P）的活化形式。此反应的平衡虽倾向于核碱基 + P-Rib-PP的方向，但所生成的焦磷酸可被焦磷酸酶水解为磷酸，因而NMP能够由相应的核碱基而产生。

当PRTase在利用胞内核碱基时，血液中的核苷如腺苷和尿苷的浓度却比其相应的核碱基腺嘌呤和尿嘧啶的高得多（$\sim 1\mu molL^{-1}$）。事实上，脑可通过补救合成由肝脏产生并释入

间的为甲醇（CH_3OH）、甲醛（CH_2O）和甲酸（$HCOO^-$）。

问题：所有上述的一碳化合物都参与“C1 代谢”吗？

甲烷和二氧化碳不参与。甲烷是许多微生物的无氧代谢终产物，二氧化碳（用于羧化反应）则由含生物素的酶所调控。

表 15.4 列出了四氢叶酸衍生物所带的各种一碳基团。

这些一碳基团可在 5 或 10 位置（图 15－19）与 N 原子连接，或于二者之间搭桥。哺乳动物体内，N^5－亚甲基四氢叶酸可由亚甲基－THF 还原酶催化的不可逆反应而形成；其他的 THF 衍生物则可通过一系列的氧化-还原反应和水合-去水合反应而相互转化：

表 15.4　四氢叶酸（THF）衍生物

所带基团	THF 衍生物
$—CH_3$	N^5－甲基－THF
$—CH_2OH$	N^5，N^{10}－亚甲基－THF
—CHO	N－甲酰－THF
—CH═	N^5，N^{10}－甲川－THF

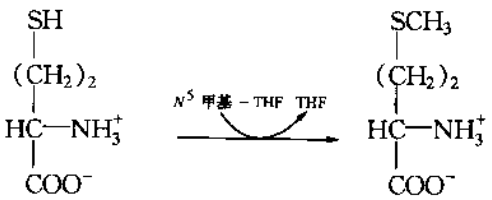
N^5－甲基－THF ←N^5，N^{10}－亚甲基－THF N^5，N^{10}甲川－THF → N^{10}－甲酰－THF

问题：补充 THF 中 C_1 单位的主要反应是什么？

除了 N^5－甲基－THF 以外，THF 衍生物都是由一个适当氧化态的 C_1 单位与 THF 直接合成的。主要的添补反应是由丝氨酸羟甲基转移酶催化的反应（见 15.1）。

生物甲基化作用

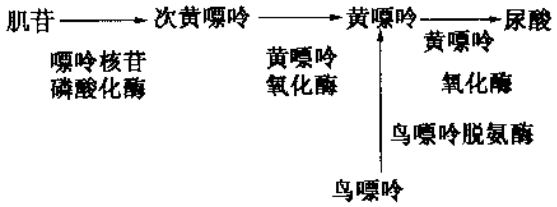
甲基转移是常见的生化反应，某一分子中甲基的引入是修饰其生物活性的重要途径，如肾上腺素与去甲肾上腺素。甲基来源于 N^5－甲基四氢叶酸，虽然此化合物仅直接与一个甲基化反应相关。该反应的最简单形式是在植物体内进行的，由高半胱氨酸转甲基酶催化：



高半胱氨酸　　甲硫氨酸

哺乳动物甲硫氨酸的合成更加复杂，并需要钴胺素的参与，钴胺素是维生素 B_{12}的辅酶形式。要注意到甲硫氨酸是必需氨基酸，必须由食物供给；被用于甲基化作用（图 15－20）的甲硫氨酸降解为高半胱氨酸，高半胱氨酸被重新甲基化则又可生成甲硫氨酸。这些反应仅仅是甲硫氨酸的循环，并不是甲硫氨酸的净合成。

人体内过量的 AMP 可脱去氨基成为 IMP。IMP 再被 5′-核苷酸酶水解产生肌苷。肌苷与鸟嘌呤氧化为尿酸的过程如下：



因此，因缺乏尿酸酶，我们每日仅能分泌很少量的尿酸。肝脏每天约合成 0.8g 的尿酸，但只有 20%～50%进入消化道于胃液和胆汁中，并被微生物所降解。对于某些动物（排尿酸动物，如鸟类），尿酸是其排出多余氮的形式。除非像人类一样缺乏尿酸酶以外，非排尿酸生物体可将嘌呤降解为尿素、氨和二氧化碳。嘧啶也可被降解为尿素与氨。

15.7　一碳化合物的代谢

叶酸的衍生物

以上所描述的很多过程都利用到了四氢叶酸的一碳衍生物（图 15－19）。例如，嘌呤环的合成就需要 N^{10}-甲酰四氢叶酸的参与。胸苷酸合成酶，嘧啶合成中的关键酶，将 N^5，N^{10}-亚甲四氢叶酸既当作底物，又当作还原剂。此化合物，C_1 代谢中最重要的化合物，还与丝氨酸、甘氨酸的相互转化相关。所有 C_1 化合物都是 5，6，7，8－四氢叶酸的衍生物，5，6，7，8－四氢叶酸是维生素叶酸的还原形式。

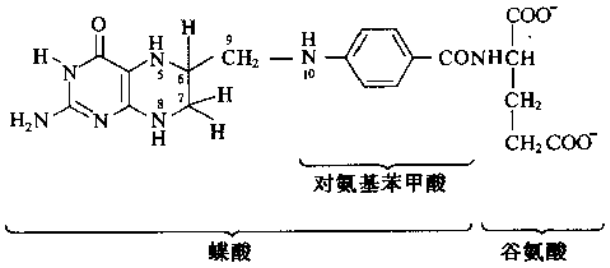
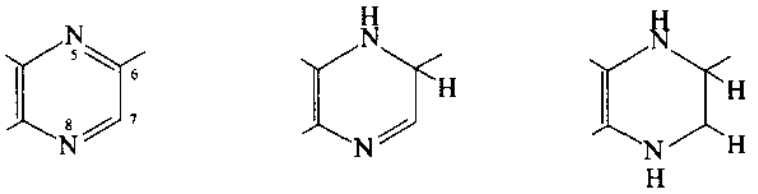


图 15－19　四氢叶酸

四氢叶酸的蝶酸部分由还原形蝶啶环与 p-氨基苯甲酸组成。膳食中的叶酸被肠粘膜吸收，并经两个酶促反应而被还原为四氢叶酸，四氢叶酸是辅酶的活性形式。哺乳动物不能合成叶酸，但其肠道微生物能够轻易合成叶酸。

叶酸还原为四氢叶酸的两个步骤是由二氢叶酸还原酶催化的。这两个反应都需要 NADPH 提供电子。



二氢叶酸　　叶酸　　四氢叶酸

为了搞清楚与四氢叶酸相关的反应的复杂性，首先要了解，在生物体系中，一碳化合物能够以五种不同的氧化态形式存在。最高还原态为甲烷 CH_4，最高氧化态是 CO_2。处于这两者之

高半胱氨酸的碳骨架被补救合成甲硫氨酸（图 15－20）。高半胱氨酸也可被用于合成胱氨酸。

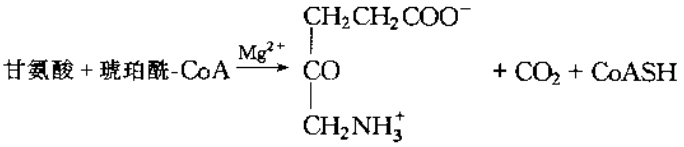
图 15－20 所示的循环的重要性在于其可保存高半胱氨酸。被用于合成蛋白质的甲硫氨酸与半胱氨酸将自循环中消耗高半胱氨酸，故，至少甲硫氨酸必须由饮食中补充。

15.8 卟啉代谢

血红素的前体化合物卟啉的合成与转换极为重要，因血红素蛋白，血红蛋白和细胞色素在代谢中有着至关重要的作用。可以认为，血红蛋白的合成是人体氮经济的主要部分。

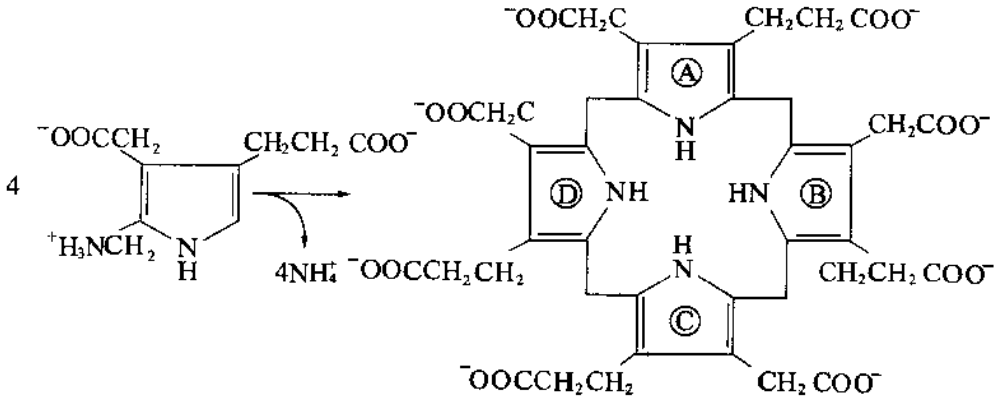
卟啉的合成

卟啉合成的第一步是琥珀酰－CoA 与甘氨酸缩合为 δ－氨基酮戊酸。因琥珀酰－CoA 存在于线粒体内，故，反应在线粒体中进行。此反应可逆，并需要磷酸吡哆醛和 Mg^{2+} 的参与。反应过程由 δ－氨基酮戊酸合成酶催化。



δ－氨基酮戊酸

随后的反应在细胞质中进行，并且不可逆。经胆色素原合成酶的催化，2 分子 δ－氨基酮戊酸缩合形成 3 个吡咯取代的胆色素原。再经尿卟啉原合成酶与尿卟啉原辅合成酶这两种酶的作用，4 分子胆色素原缩合为卟啉尿卟啉原 III。



胆色素原　　尿卟啉原 III

要注意到，尿卟啉原 III 并非对称分子。其合成过程中，其中一个吡咯环是反向的，使得卟啉环上的乙酸根与丙酸根侧链的排列不对称。细胞色素和血红蛋白的合成过程中，关键的卟啉中间体是原卟啉 IX（图 15－21）。

原卟啉 IX 的合成包括尿卟啉原 III 侧链上的两个变化：乙酸根脱羧为甲基，A 环和 B 环上的丙酸根脱羧成为乙烯基（ —CH═CH_2 ）。第一步脱羧反应是在细胞质中进行的，而乙烯基的形成和亚甲基桥（ —CH_2— ）向不饱和亚甲基（ ═CH— ）的转化过程则是在线粒体内进行的。这些反应的终产物为芳香族平面的原卟啉 IX 分子。在线粒体内进行的最后一步反应是原卟啉 IX 与 Fe^{2+} 螯合生成血红素，此反应为自发反应，亚铁螯合酶可提高反应速度。

血红素是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶和过氧化物酶的功能基团。上述这些物质有着完全不同的功能：血红蛋白可携带氧；肌红蛋白则储存氧；细胞色素传递电

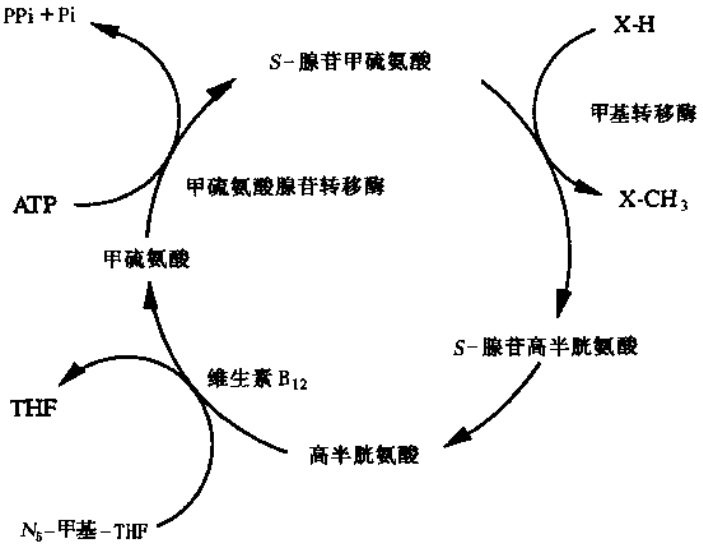
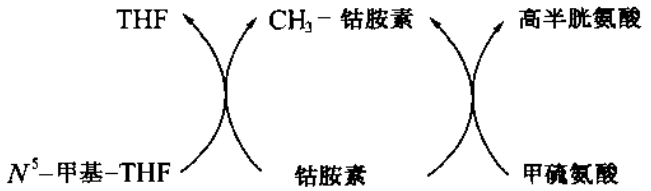


图 15-20　甲硫氨酸代谢

例 15.17

植物中不存在维生素 B_{12}，严格的素食者会缺乏维生素 B_{12}。因此，我们必须依赖于动物或细菌源而获取所需的维生素 B_{12}。

钴胺素是含 Co 原子的复合物。哺乳动物合成甲硫氨酸的过程中，钴胺素作为辅酶接受来自 N^5-甲基四氢叶酸的甲基，并转移给高半胱氨酸。反应由钴胺素-N^5-甲基-THF：高半胱氨酸转甲基酶催化。总反应为



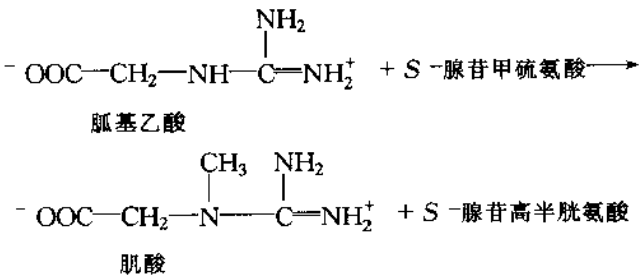
例 15.18

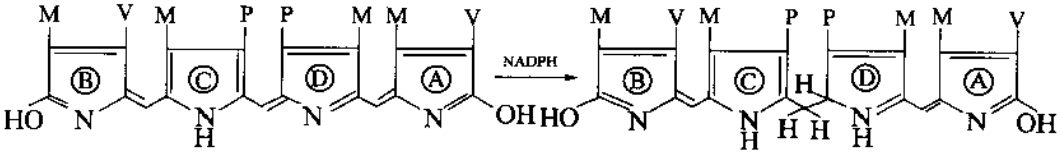
维生素 B_{12}缺乏的一方面便是引起 N^5-甲基-THF 的蓄积。哺乳动物中 N^5-甲基-THF 的合成是由一个不可逆反应（如前所述）完成的；若因维生素 B_{12}的缺乏而不能使其被利用，则必将蓄积。如此，会引起其他形式的 THF 耗尽，从而导致 THF 的不足。巨成红细胞贫血（恶性贫血）即是与钴胺素和 THF 缺乏相关的疾病。

甲硫氨酸被转化为 S-腺苷甲硫氨酸时，其结构上的甲基被活化。在生物甲基化过程中，正是此 S-腺苷甲硫氨酸为甲基的直接供体。以 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体的重要反应包括肌酸、肾上腺素和磷脂酰胆碱的合成。

例 15.19

肌酸是由胍基乙酸（自甘氨酸与精氨酸合成）合成的。





胆绿素　　胆红素

上述的结构中，M＝甲基，V＝乙烯基，P＝丙酸根。胆绿素和胆红素都是胆色素，与组织青肿状态的绿色和橙红色相近。水不溶的胆红素被释入血浆中，与白蛋白复合，随血流被转运至肝脏。在肝脏内因被转化为胆红素二葡糖苷酸（90%）和硫酸胆红素（10%）而水溶。

例 15.21

葡萄糖醛酸是葡萄糖的衍生物。C－6 位上的－CH_2OH 被氧化为－COOH。葡萄糖醛酸的活化形式是 UDP－葡萄糖醛酸，可被用于合成葡萄糖苷酸，如胆红素二葡糖苷酸。由于葡糖苷酸中－OH 和－COO^- 基团是极性的，故，将化合物转化为相应的葡糖苷酸盐（和硫酸盐）是提高其可溶性的常见方式。这一点对于经胆汁排出的一些不可溶化合物极为重要。

胆红素二葡糖苷酸是由肝脏分泌的，通过胆汁进入肠腔。在肠道内水解，血红素被还原为尿胆素原和粪胆素原。经过肠道再吸收以后，上述两种化合物分别以尿胆原和粪胆原的形式被分泌入尿与粪便中；这些色素将它们的特征色赋与了尿和粪便。

问题解答

氨基酸的合成及其膳食来源

15.1　高浓度的 NADPH 和 2－酮戊二酸对氨的同化作用有何影响？

答：

这两种化合物中任何一种浓度的升高，都会使谷氨酸脱氢酶催化的反应倾向于谷氨酸的生成。此反应向右进行，导致氨同化作用的发生。

$$NH_4^+ + \text{2－酮戊二酸} + NADPH \rightleftharpoons \text{谷氨酸} + NADP^+ + H_2O$$

15.2　若草酰乙酸和 2－酮戊二酸被用于氨基酸合成，那么，TCA 循环将如何进行？

答：

自 TCA 循环脱去的草酰乙酸或 2－酮戊二酸必须得到补充。丙酮酸经丙酮酸羧化酶的作用被转化为草酰乙酸，草酰乙酸进入 TCA 循环产生 2－酮戊二酸。

15.3　饱食状态下，转氨基过程中净碳通量有何流向？

答：

饱食状态下，蛋白质与碳水化合物充足，食物蛋白被水解为氨基酸。不用于蛋白质合成的氨基酸经转氨酶的作用转化为 2－酮酸。随后 2－酮酸又被转化为脂质和碳水化合物而储存起来。谷氨酸脱氢酶能够催化氨基酸衍生出的过量氨基生成氨；氨再以尿素的形式排出。

15.4　肌肉氨基酸代谢产生的丙酮酸的去向是由什么因素决定？

答：

正常饱食状态下，丙酮酸被丙酮酸脱氢酶复合体（PDH）氧化，但在饥饿状态下，PDH 无活性；因此，丙酮酸被转化为丙氨酸（图 15－16）而进入血液，血液将其运至肝脏，被肝脏内进行的糖异生作用所利用。

蛋白质的消化

15.5　蛋白质消化后，蛋白酶有何去向？

答：

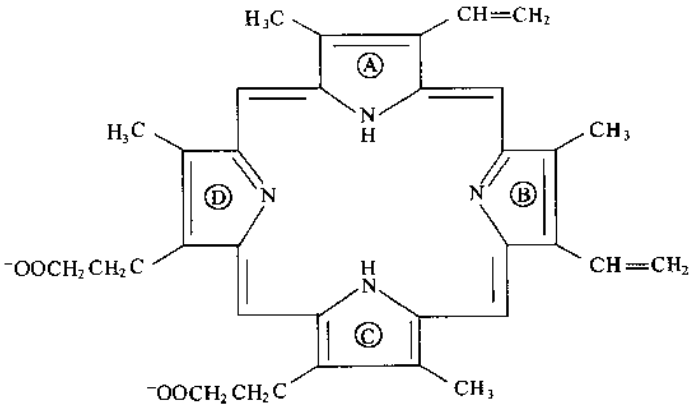


图 15－21　原卟啉 IX 的结构

子；过氧化氢酶和过氧化物酶能够催化过氧化氢的分解，过氧化物酶还可以催化一些氧化过程。

例 15.20

不同蛋白中血红素基团的功能是由什么决定的？

虽然血红素与各种蛋白质的结合方式各不相同，但主要还是蛋白的氨基酸序列决定了分子内卟啉的功能。

网织红细胞内血红素合成的调控

血红素的合成主要由 δ－氨基酮戊酸合成酶（ALA 合成酶）控制。有两种控制机制存在，每一个都与影响酶浓度的过程相关。首先，大鼠肝脏实验显示 ALA 合成酶的半衰期非常短（60～70min）。与很多线粒体蛋白一样，ALA 合成酶也是由核基因编码，于细胞质核糖体上合成，而后被转运入线粒体的。其次，主要的调节因素是 ALA 合成酶可受氯高铁血红素的抑制。氯高铁血红素与血红素所不同的是其分子中的 Fe 为氧化态的 Fe^{3+}。当无球蛋白与之形成血红蛋白时，血红素即自发被氧化为氯高铁血红素。在网织红细胞内血红蛋白合成的调节方而氯高铁血红素还发挥着第二个功能，即控制球蛋白的合成。

高浓度的氯高铁血红素可抑制 ALA 合成酶转运入线粒体，而线粒体内其底物之一琥珀酰－CoA 已经生成。因而，直至产生了足够的球蛋白与已有的血红素结合，血红素合成才解抑制。氯高铁血红素的缺乏或低浓度，相当于发出了不需要球蛋白的信号；故，血红蛋白（和，球蛋白）合成受抑制。氯高铁血红素缺乏时，蛋白激酶被激活；进而磷酸化了（真核生物）蛋白质合成的一个起始因子 eIF－2，它可阻断多肽链合成的启动（见第 17 章），从而最终抑制了球蛋白的合成。

血红蛋白的降解

人体红细胞的寿命约为 120 天，每日有占总量 0.85% 的红细胞在脾脏、肝脏与骨髓的网状内皮细胞内分解。在网状内皮细胞的消化囊内红细胞溶解，血红蛋白被降解。随后球蛋白水解为氨基酸，血红素则按下述方式代谢。在 A 环和 B 环之间卟啉环被氧化切断，产生线性的四吡咯胆绿素（绿色）。完全氧化反应需要氧与 NADPH 的参与，终产物为胆红素（橙红色）。Fe^{2+} 则被运铁蛋白补救储存于脱铁铁蛋白内，连接 A 环和 B 环的亚甲基桥以 CO 形式脱去。

答：

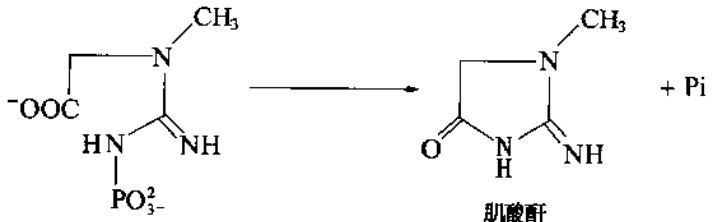
食入含有必需氨基酸 2-酮酸对应物的低氮饮食即可降低氮浓度。

15.10　请预测下列生物是以何种形式将余氨排出的：蝌蚪类、蛙类、鸟类和哺乳动物。

答：

由于是水生动物，蝌蚪可利用扩散与稀释的方式脱去多余的氨，但水陆两栖的蛙类以尿素的形式排出。鸟类和爬行动物排出尿酸。大部分哺乳动物也以尿素形式将余氨排出。

15.11　肌酸是尿内重要的含氮成分。它的生成不需要酶催化，是由肌肉内的磷酸肌酸经磷酸解作用后自发环化而形成的。



磷酸肌酸　　肌酸酐

磷酸肌酸的生成很重要吗？

答：

磷酸肌酸的生成速率是恒定的；生成量则依赖于肌肉的量。因而，个体排出磷酸肌酸的量基本恒定（成年男性每日排出 1～1.5g）。磷酸肌酸的排出意味着甲基的净丢失。

嘌呤与嘧啶代谢

15.12　尿酸晶体会在关节部位沉积，引发被成为痛风的疼痛。反过来，是什么引起了尿酸晶体的沉积的呢？

答：

痛风是因为嘌呤的过量生成，或肾脏不能分泌尿酸而造成，嘌呤的过量生成可导致尿酸过量产生。因其不可溶，故尿酸沉积在关节内，引发炎症。

15.13　Leslch-Nyhan 综合征是一种很痛苦的疾患，涉及神经失调，自残，和尿酸的过量形成。为什么尿酸会过量生成？

答：

Leslch-Nyhan 综合征是因为涉及次黄嘌呤和鸟嘌呤（HGPRTase）补救途径的磷酸核糖转移酶的缺失而引起的。P-Rib-PP 的蓄积可刺激嘌呤的生物合成。

15.14　什么因素可引起遗传性乳清酸尿症？

答：

乳清酸磷酸核糖转移酶的遗传性缺失导致了乳清酸的蓄积，进而分泌入尿中。

15.15　为什么腺苷脱氨酶的缺失会导致严重的联合免疫缺损？

答：

缺少腺苷脱氨酶的患者不能够将腺苷降解为肌苷，或不能将脱氧腺苷降解为脱氧肌苷。蓄积的脱氧腺苷（dAdo）将按下式被转化为核苷酸：

$$dAdo \rightarrow dAMP \rightarrow dADP \rightarrow dATP$$

毫摩尔水平的 dATP 即可杀死 T 和 B 淋巴细胞，导致免疫缺损。

一碳化合物的代谢

15.16　磺胺类是抗菌剂，是 *p*-氨基苯甲酸的 S 类似物。其中结构最简单的为对氨基苯黄

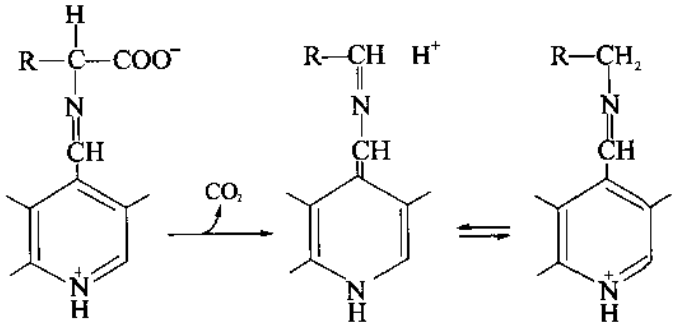
蛋白酶和其他的胰酶如胰脂酶最终被（蛋白酶）降解。消化可造成每日约50g内源性蛋白的转换。转换既由胰酶的分解造成，也由肠道上皮细胞每24小时一次的脱落而引起。

氨基酸的分解代谢

15.6 磷酸吡哆醛是氨基酸脱羧过程中的一个辅酶。那么，此脱羧作用的可能机制是什么，产物又是什么？

答：

如同转氨基作用一样，第一步是在氨基酸和磷酸吡哆醛之间形成希夫氏碱：



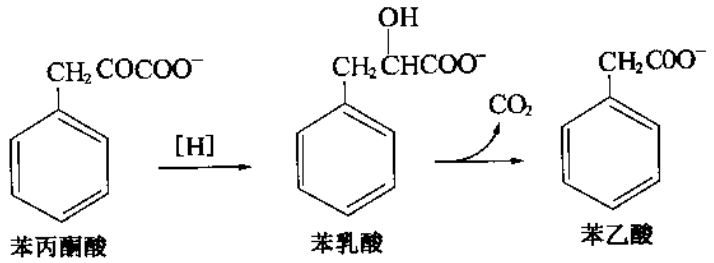
四价氮就象一个电子吸收池，使得脱羧作用易于进行。氨基酸与吡哆醛之间电子与质子的进一步移动产生随后可被水解的希夫氏碱。

氨基酸的脱羧作用与多种在代谢方面很重要的胺类的合成相关，如，色氨酸脱羧成为5-羟色胺，组氨酸脱羧为组胺，谷氨酸脱羧为γ-氨基丁酸（GABA）。

15.7 可引起严重智力迟钝的苯丙酮尿症的特征是苯丙酮酸尿的分泌。这是如何形成的？

答：

苯丙酮尿症是由先天性苯丙氨酸代谢障碍造成的。典型的病症，是因苯丙氨酸羟化酶的缺失引起的。非典型的，则是因二氢生物蝶呤还原酶的缺失及随之产生的生物蝶呤合成的不可能性而造成的。所有这些因素都可导致苯丙氨酸的蓄积，苯丙氨酸被转氨基而成为苯丙酮酸。



苯丙酮酸可被还原为苯乳酸，也能被氧化为苯乙酸，二者均可被分泌入尿中。

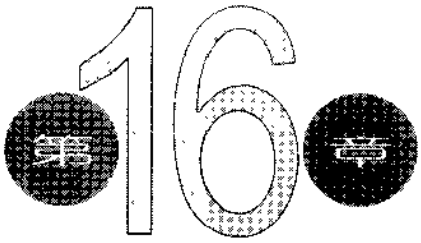
多余氮的处理

15.8 在什么条件下，瓜氨酸、精氨基琥珀酸或精氨酸会在肝脏内蓄积？

答：

这几种氨基酸中任意一种的蓄积都是因为尿素循环（见15.5）中其相应酶活性的降低，导致整个循环活性的下降。先天性的代谢障碍便是因这些酶的缺失而造成的。尿素循环活性的降低会导致血液中氨水平的上升，称为高氨血症，高氨血症可引起恶心、呕吐，甚至昏迷。

15.9 高氨血症可控制吗？



遗传物质的保持和复制

16.1 导言

DNA是细胞的遗传物质，即它含有基因。一个独立的基因由一段DNA（最多到数个kb）片段表示，最终表达为一条多肽链，通常为一个结构蛋白或酶。DNA存在于一个细胞的染色体内，而一条或多条染色体组成基因组。基因组代表一个特定细胞的一整套完整的基因信息。每条染色体都包含大量基因。在细胞分裂期间，染色体DNA必须产生它自身的精确复制物（拷贝），以便分离和分配到子细胞中。产生DNA拷贝的过程就是复制，此过程与新的DNA链的合成有关。

对于正常细胞的生长和增殖，必须保护DNA不受各种类型的损害。例如通过uv射线诱导的损害能够参与DNA的化学改变，其结果是产生有害的突变。细胞具有校正或修复这种损害的能力。了解的最清楚的修复机制之一与新DNA的合成有关，新合成的DNA可以替换损害的部分，这个机制称为DNA的修复合成。与染色体DNA的合成相比，修复合成的范围很小。

许多细胞（细菌、植物和动物）的大多数基因都含有一个、两个或少量的拷贝。然而，为了响应某种情况，一些细胞的一个特定基因将产生许多个拷贝，这就是基因或DNA的扩增，它主要与DNA的特异性片段的多倍复制有关。

例16.1

动物细胞中DNA复制和修复的错误能够导致患癌症的倾向，这有助于重视生物中的这些过程。然而，我们对这些过程分子机制的许多了解来源于对相对简单的细菌的研究。

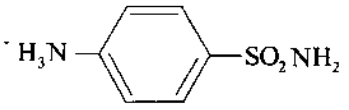
16.2 DNA的半保留复制

大多数生物体的染色体中的DNA为双螺旋结构，即它是由两条多核苷酸链相互缠绕形成螺旋形式。基因信息就包含在其中一条链的核苷酸的序列上，一条链的序列与另一条互补（第7章）。DNA的复制物就是它自身的精确拷贝。

问题：DNA的什么结构特征为复制物中的原始核苷酸序列的复制提供了基础？

双螺旋DNA的每一条链都通过互补碱基对与另一条链结合，其中一条链上的腺嘌呤（A）与另一条链上的胸腺嘧啶（T）以氢键结合，鸟嘌呤（G）和胞嘧啶（C）相互配对结合。Watson和Crick提出，为了获得一个核苷酸（碱基）序列的精确复制，DNA的两条链必须相互解旋以使每一条单链为一个新DNA合成的模板。因此，新合成链中序列的装配由模板中序列的碱基对的特异性决定。图16-1（DNA双螺旋表示为梯形结构）说明了这点。

酰胺。


磺胺

对氨基苯甲酸

磺胺类药物是如何起到抗菌作用的?

答:

磺胺类药物作为可结合入叶酸的 p-氨基苯甲酸的竞争性抑制剂而发挥作用的，没有叶酸细菌无法生长。

卟啉代谢

15.17 先天性代谢障碍常常与某一种酶的缺少或缺失相关。那么，酶的过量生成同样也会引起先天性代谢障碍吗?

答:

肝内δ-氨基酮戊酸合成酶的过量生成引起了两种先天性血卟啉病。这两种疾病的特征是卟啉过量生成，及大量δ-氨基酮戊酸与胆色素原的排出。部分种群该病的发生率很高，患病人群会因被给予了巴比妥盐和其他可诱导此酶合成的药物而急性发病。

补充问题

15.18 为什么高能低氮饮食会导致营养不良?

15.19 以干酪取代肉类的膳食在氮含量方面是否营养充足?

15.20 什么样的蛋白酶能够完全水解下列肽?

(a) Tyr-Phe-Gly-Ala

(b) Ala-Arg-Tyr-Glu

(c) Leu-Trp-Lys-Ser

15.21 由饮食而来，及禁食期间由肌肉蛋白水解产生的谷氨酰胺可在肠道内被转化为丙氨酸。哪类酶与此转化过程相关?

15.22 精氨酸可在尿素循环中合成，为什么将其归类于必需氨基酸?

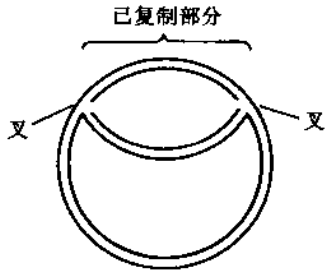


图 16－2　复制的环状细菌染色体

问题：细菌染色体复制的起点是一个固定的位置还是一个变化的位置？

遗传研究表明复制起点存在于一个固定的位点，被称作起始位点或染色体复制起点（*oriC*）。这个区域的核苷酸序列结合了各种蛋白质以启动两个叉的复制。

问题：当两个复制叉在与 *oriC* 相对的位置相遇时将发生什么情况？

接近的两个叉相遇时，将释放两个完全的环状分子（子分子），这被称为复制终止。复制叉相遇和融合的位置称为末端区域（tr），并且有一个特异性机制以保证融合位点限制在这个区域内。

例 16.2

染色体复制起始在一个固定位点以及复制叉从这个位点向终止区域的移动，表明这个过程中基因以固定顺序复制。通过测定从生长细胞分离到的 DNA 中基因的相对拷贝数即可证实这点。靠近复制起点的基因比靠近终止区域的基因平均拷贝数高。

细菌染色体的复制可以分为三个阶段：起始、延伸和终止（图 16－3）。起始指复制叉产生的开始；延伸描述了这些叉围绕染色体前进，并同时伴随 DNA 的合成或链的生长；终止指接近的两个复制叉的融合，最后的结果是产生两条完整且能彼此分离的染色体。

术语复制子用于描述在一个起始点的调控下所复制的单位。因此，细菌染色体是一个复制子，它的复制受 *oriC* 的调控。下面将详细讨论。

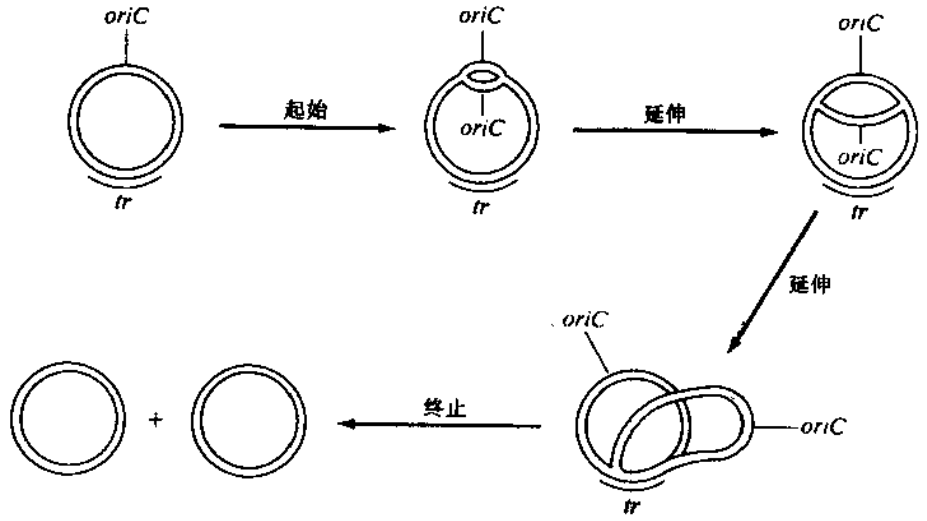


图 16－3　一条细菌染色体复制的阶段

问题：所有环状、双螺旋 DNA 分子均与细菌染色体以同样方式复制吗？

不完全如此。如果有明确的复制起点时，与细菌染色体的复制方式相同。但是，在某些情况下，如一些质粒，复制将围绕 DNA 分子的单一方向进行，这种复制称为单向复制。另外一些情况下，复制将以一种不同类型的眼形式即 D 环进行，例如线粒体 DNA（第一章），它的序列相对复杂并且只参与了 DNA 分子一条链的单向复制。

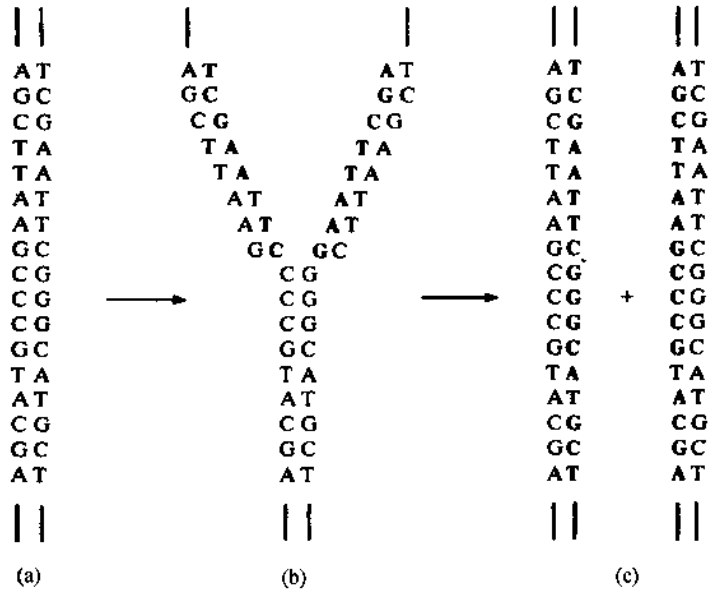


图 16－1　解旋 DNA 作为复制的模板。粗体字母代表新合成的 DNA

在图 16－1 中，被复制的 DNA（a）的解旋方向从上到下，部分复制结构（b）表现为 Y 形并且含有一个复制叉。这个结构的每一个臂中，新合成链（以粗体表示）是按照未解旋模板链的碱基对指令进行装配的。(a) 中的序列长度仅代表了染色体中一个巨大 DNA 分子的非常小的一个片段。完全复制好的片段见（c），(a) 中 DNA 的两条链现在彼此分离，每一个都含有一条原始链和一条新链。DNA 的亲代片段产生了两个子片段，它们也将通过后代而保持完整。

问题：DNA 半保留复制的含义是什么？

半保留复制指当一个亲代 DNA 结构复制为两个子代分子时，亲代 DNA 结构只有一半保留。因此，在图 16－1 中，亲代 DNA 的每一条链都作为一个模板，它们通过增代过程保留其完整性。

16.3　DNA 复制的拓扑学

一条染色体通常包含一个很大的 DNA 分子，例如，一些细菌染色体由 4×10^6 碱基对组成。而且在很多情况下，DNA 为闭合或环状结构。一些细菌染色体为线性的。我们将首先集中在环状细菌（*E. coli*）染色体复制的拓扑学上。在这方面，我们对线性细菌染色体的了解还很少。

问题：一个复制的细菌染色体（环状 DNA 分子）采用的为什么形式？

复制的细菌染色体仍为闭合形式，DNA 分子中已复制的部分在复制叉与未复制的部分相连接（图 16－2）。

问题：图 16－2 中复制的细菌染色体含有两个叉，这两个都是复制叉吗？

是，两个叉均积极地参与 DNA 复制并以几乎相等的速率和相反的方向围绕环状分子移动，这种复制为双向复制。分子的复制部分被称为复制泡或眼形式（因其简图中的形状）。泡从非常小到接近于非复制染色体的两倍进行变化。显然，环状分子中非常小的泡所在的位点代表复制起始的区域。

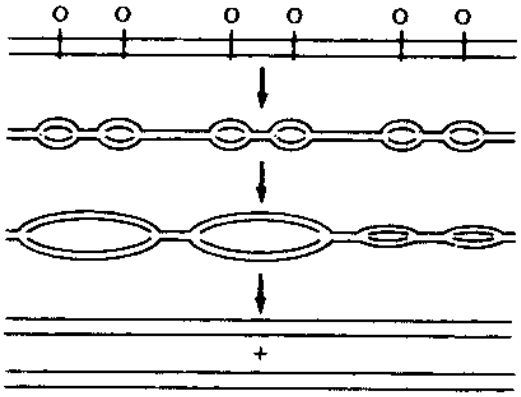


图 16－5　复制子在真核生物 DNA 中的串联排列产生了一系列复制泡。O 代表复制起点

16.4　DNA 复制的调控

DNA 复制的速率与细胞分裂的速率相等。因此，与生长在贫瘠培养基中相比，一个细菌生长在丰富培养基中的培养物代时较短，并且染色体的复制完成较快。在贫瘠培养基中的代时可能是丰富培养基中的三到四倍。

问题：细菌 DNA 复制的速率是根据什么机制变化的？

在全营养条件和固定的温度下，复制叉移动的速率保持相当的一致。DNA 复制的总体速率由 DNA 在 *oriC* 的起始频率决定。为了加快复制，子起点的复制起始发生于复制周期完成之前。这导致形成多叉染色体，如图 16－6 所示。注意多叉染色体含有至少四个拷贝的 *oriC*。

图 16－6　通过在 *oriC* 复制的再起始而产生的多叉染色体

真核生物中 DNA 复制的调控比在细菌中复杂得多。一旦一个细胞进入 S 期，整个基因组中多数的独立的复制子可能以固定的顺序进行复制。在某些情况下，S 期的持续时间可能变化非常大。

例 16.5

一个果蝇的卵授精后首先形成的两个核仅在几分钟之内就分裂了，因此，S 期的长度非常短。在这种情况下，相邻复制子的起点间的距离比正常间距的 7～8kb 就短得多。整个基因组复制很快因为每一个复制叉在与邻近的复制叉融合前仅跨越几个 kb。

5 000kb 的细菌染色体的复制刁约需要 40 分钟，并且贯穿整个细菌分裂周期。因此，每一个复制叉每分钟复制大约 50kb 的 DNA。在真核细胞中，DNA 复制是限制在有丝细胞分裂周期的 S 期进行，这个时期持续大约几个小时。

例 16.3

真核生物的细胞周期可分为四个时期，G_1、S、G_2 和 M（图 16－4）。周期从 G_1 开始（G＝代），通常是时间持续的主要时期。DNA 的复制从 S 期开始，到进入 G_2 期之前结束。有丝分裂或 M 期相对较短并且包括染色体分离和分配到两个子细胞中的过程。

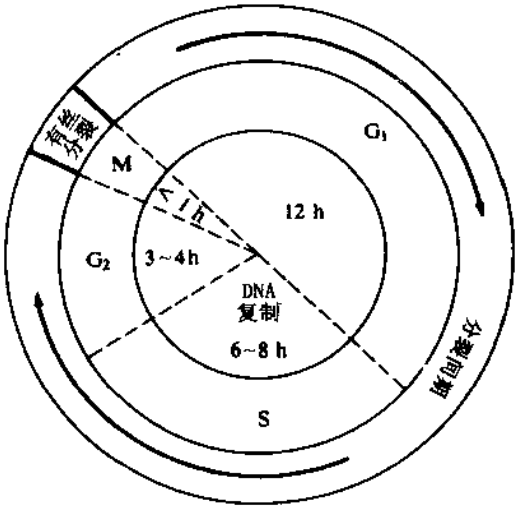


图 16－4　真核生物的细胞周期。所示为典型的高等真核生物细胞在组织培养时四个时期的持续时间

问题：一个真核细胞含有相当于细菌染色体 1000 倍的 DNA。真核生物 DNA 的复制怎样在 S 期（几个小时）内完成？

通过电子显微镜对真核生物 DNA 复制的观察表明，DNA 存在许多串联排列的被分离为只有 30～300kb 的泡，20～80 个这样的泡聚集在一起存在于 DNA 的各个区域。每一个泡的两个复制叉代表了以相反方向复制的位点，这些复制叉将与邻近泡所产生的相邻的复制叉融合。因此，真核生物 DNA 包含了许多串联排列的复制子，每一个都有一个复制起点。事实上，真核生物中复制叉的移动速率比细菌的慢 10%，但因为有多个复制起点，因此基因组能在有效的时间内完成复制。

例 16.4

所培养的哺乳动物细胞大约含有 20 000 个起点。如图 16－5 所示，起始于每一个起点 O 的复制叉在与相邻复制子复制叉融合（或终止）前仅需跨越相对短的距离。

们作为从复制叉开始 DNA 合成的模板。当环继续滚动，就能够产生一条线性双螺旋分子，这个分子是含有多个拷贝的序列。滚环机制也是一些病毒 DNA 分子复制的一个阶段。

16.5　细菌 DNA 复制的酶学

正像已经讨论过的，一个复制子的复制可分为三个阶段：起始、延伸和终止。在延伸期，DNA 链的生长发生于复制叉。

延伸期是检验参与复制的一些重要的酶和其他蛋白质的一个良好阶段。我们已较为清楚得了解了发生在细菌 *E. coli* 中的这个过程，它可作为其他系统的原型。这个过程将涉及几种酶和蛋白质。

问题：哪一个酶负责在复制叉上新 DNA 链的合成？

是一个以解旋的、单链 DNA 为模板的 DNA 聚合酶。在 *E. coli* 中有三种不同的 DNA 聚合酶：DNA 聚合酶 I、II 和 III。DNA 聚合酶 I 含量最丰富，DNA 聚合酶 III 含量最少。这两个酶在 DNA 复制的整个过程中有重要作用。DNA 聚合酶 II 的作用到目前为止还不清楚。

DNA 聚合酶 I

E. coli 的 DNA 聚合酶 I 已被详细研究。它利用四种脱氧核苷三磷酸（dNTP）和 Mg^{2+} 催化由模板指导的核苷酸的聚合化作用（图 16－9）。在这个反应中，一个新的 dTTP 位于模板中腺嘌呤（A）的对面（通过碱基配对），通过生成链的 3′羟基对新加入的三磷酸的 α－磷酸的亲核性攻击形成磷酸二酯键，焦磷酸（PPi）释放。第二个核苷酸接着将链进一步延伸，就一直这样进行下去。生长只延 5′→3′方向进行。另一个重要特征是酶只能加入到先前存在的链中（引物），它并不能开始一个新链的合成。细胞中释放后的 PPi 被焦磷酸酶快速水解后推动反应向 DNA 链生长的方向进行。被聚合酶 I 催化的整个反应为：

$$(dNMP)_n + dNTP \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} (dNMP)_{n+1} + PPi$$

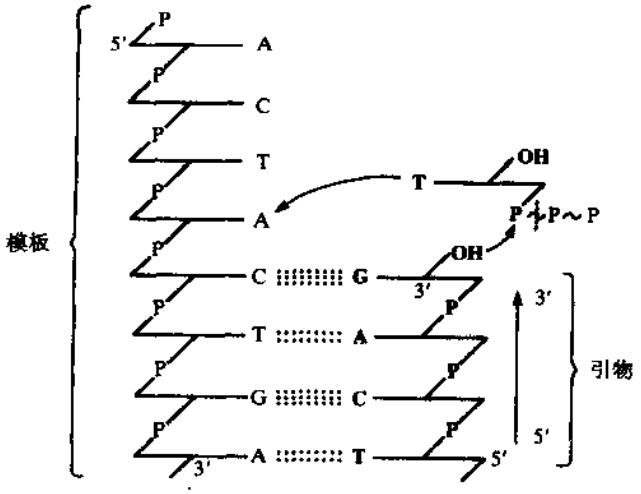


图 16－9　模板指导的由 DNA 聚合酶 I 催化的一个核苷酸单位添加到一条生长的 DNA 链。粗体字母代表新合成的 DNA。点划线代表氢键

问题：真核生物中独立的复制子能是否能像细菌那样可以重新复制从而产生多叉结构?

不能，但在一些含有特异性基因扩增的特殊细胞内存在非常类似的情况。例如，许多动物发育中的卵至少包含 1000 个 rRNA 基因的拷贝(第 7 和 17 章)。在果蝇中，编码卵壳(卵)蛋白的 DNA 序列在它们需要之前大约扩增 30 倍。为了完成扩增，跨越特定基因的一小段 DNA 在一个细胞代产生之前被复制了许多次，正如图 16－7 所示。注意扩增的 DNA 附着于染色体 DNA 上 (图 16－7)。当扩增 DNA 游离于染色体时，染色体外 DNA 所指即为游离形式的 DNA。这样的 DNA 通过含有能产生环状切除序列的扩增片段的非同源重组而产生。这种环状 DNA 中的序列就能够通过滚环机制进一步扩增，以产生在一个长的线性 DNA 分子中串联排列的多拷贝。扩增的 rRNA 基因即以这种形式存在。

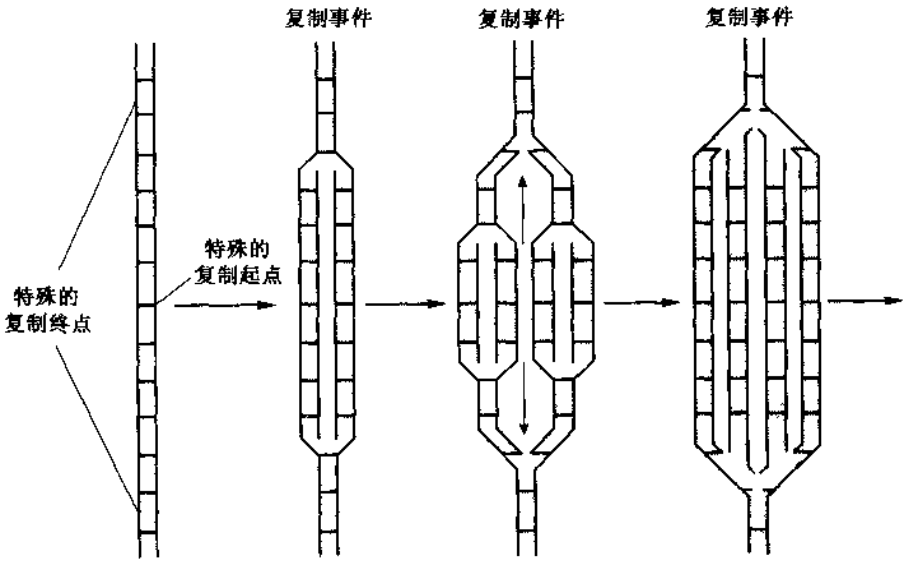


图 16－7　通过复制的 DNA 片段的扩增

例 16.6

DNA 复制的滚环机制如图 16－8 所示。

将将两条链中的一条造成切口，脱去切口链一端的圆环能够产生同等的两条单链，使它

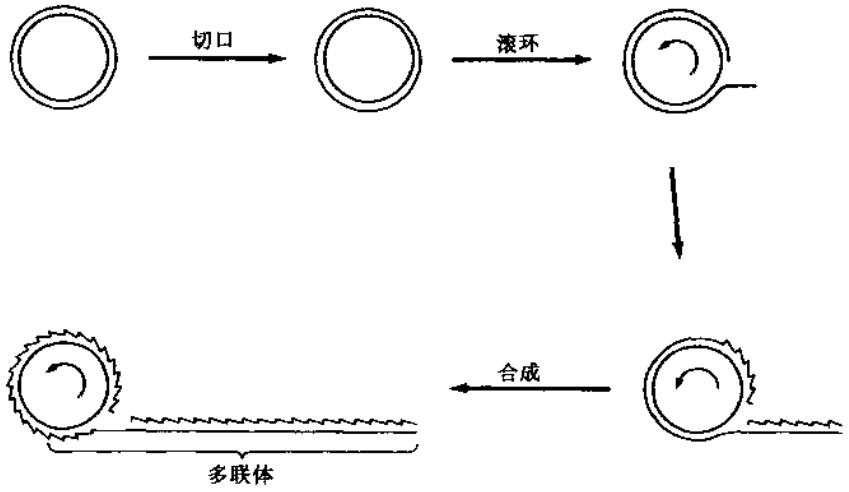


图 16－8　DNA 滚环复制机制

DNA 聚合酶不能起始一条新链的合成，它们只能延伸一条链。被称作引发酶的一种特殊类型的 RNA 聚合酶，它可以与复制叉移动的相反方向生成短的 RNA 引物，引物可以在许多区域以 5′→3′方向的 DNA 为模板进行合成，而这些模板通过螺旋的解旋不断地显露。每一个引物复制完成后引发酶就释放，随后在 DNA 聚合酶 III 全酶的作用下，DNA 链以与复制叉移动相反的方向合成。（RNA 聚合酶与 DNA 聚合酶的显著差异是它能够重新开始新链。）DNA 聚合酶 III 作用的链的延伸将继续直到新合成的 DNA 片段与相邻片段的 RNA 引物的 5′末端相遇，如图 16－12 所示。

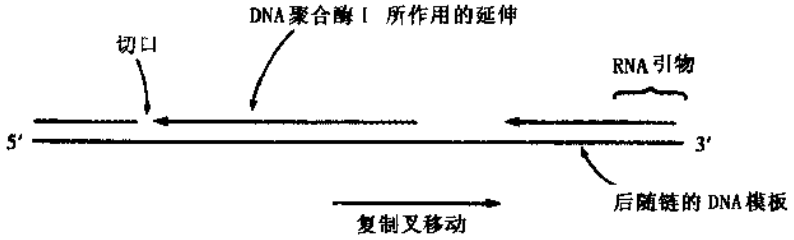


图 16－12　冈崎片段的起始和生长切口代表在多核苷酸链之间没有形成磷酸二酯键，这种情况下表现为 RNA 引物和新合成的 DNA 片段之间有切口

问题：RNA 引物延 5′→3′模板形成的起始位点由什么决定？

以 DNA 为模板形成的 RNA 是从 DNA 的启动子位点开始的（第 17 章）。为在移动的复制叉上形成引物，细胞提供了一个沿 5′→3′模板移动的可动启动子，这个启动子每隔一定的间距能够促进引发酶催化 RNA 引物合成的起始。*E. coli* 染色体中移动启动子（有时也指引发体）的作用是通过 Dnab 蛋白/酶而完成。DnaB 每隔一定的间距促进引发酶（DnaG）的作用，据推测，引发酶与 DnaB 松散的结合在一起。（DnaB 在 DNA 的解旋中也具有重要作用，见下。）

RNA 引物必须除去并以 DNA 代替。这个过程是这样完成的：当 DNA 聚合酶 III 全酶与 RNA 引物的 5′端相遇后就停止作用（并没有与 DNA 分离），而 DNA 聚合酶 I 开始作用。与其他 DNA 聚合酶相比，DNA 聚合酶 I 的一个特征就是具有在切口完成复制的能力，无论切口前面的多核苷酸是 DNA 还是 RNA。正如图 16－12 所示，DNA 聚合酶 I 结合在箭头左边的实线上并继续延伸 DNA 链。同时，它通过 5′→3′外切核酸酶活性切除 RNA 引物。整个反应就是以 DNA 取代 RNA，一直到持续到缺口越过 RNA 部分。这是切口平移的一个例子。一旦 DNA 越过切口，切口就可以连接。

问题：一条 DNA 链的切口是怎样连接的？

是通过 DNA 连接酶的作用，它催化双链 DNA 上相邻的 5′-磷酸和 3′-羟基之间形成磷酸二酯键。

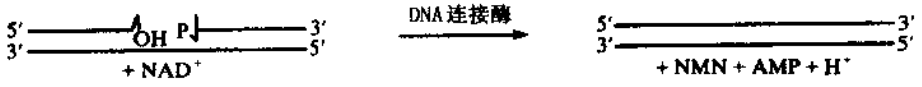


图 16－13　*E. coli* 中由 DNA 连接酶催化的反应。（NMN＝烟酰胺单核苷酸。）真核生物连接酶以 ATP 代替 NAD^+ 作为共反应物

E. coli 来源的 DNA 连接酶需要 NAD^+ 作为共反应物，其反应机制主要与 NAD^+ 的腺嘌呤基与酶形成共价结合的中间体有关。缺口的 5′-磷酸末端通过腺嘌呤基转移形成一个 DNA－腺苷酸而活化，接着通过 3′-羟基攻击活化的 5′-磷酸而形成磷酸二酯键。反应结果请见图 16－13。

然而，这只是被 DNA 聚合酶 I 催化的三种反应中的一种。其他两种催化活性主要与磷酸二酯键的水解有关，一种是作用于双链 DNA 的 5′→3′外切核酸酶，另一种是作用于双链 DNA 翻口或错配末端的 3′→5′外切核酸酶。因此 DNA 聚合酶 I 是一个多功能酶。它由一条多肽链（M_r=109000）组成。

它经蛋白酶水解断裂产生一个含有聚合酶和 3′→5′外切核酸酶活性的大片段（Klenow 片段，M_r=76 000）和一个只有 5′→3′外切核酸酶活性的小片段（M_r=35 000）。

DNA 聚合酶 III

DNA 聚合酶 III 同样也是一个多功能酶。它与 DNA 聚合酶 I 的催化活性相似。但是，在 DNA 合成的模板引物类型以及两种外切核酸酶活性作用的底物方面有细微的差异。DNA 聚合酶 III 含有许多多肽亚基（α、ε、θ、τ、γ、δ、ξ、ψ 和 β），含有所有亚基（M_r~900 000)的复合物称为 DNA 聚合酶 III 全酶，而表现聚合酶活性却只含有 α、ε 和 θ 亚基的复合物为核心酶。在体内全酶完成了大部分在复制叉上 DNA 的合成。

回想起双链 DNA 的两条链具有相反的极性（第 7 章），一条为 5′→3′方向而另一条为 3′→5′方向。但 DNA 聚合酶只能以 5′→3′方向延伸 DNA，因此在复制叉上仅有一条新链可按 5′→3′方向复制并按照复制叉的方向移动。在图 16－10 中，这种情况发生在上臂。

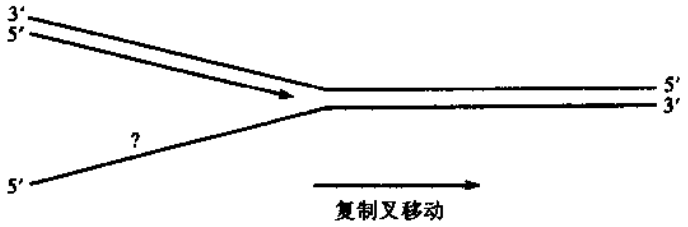


图 16－10　DNA 的一个臂中的合成与复制叉移动方向相同

冈崎片段

问题：图 16－10 显示的下臂合成的新链如为 3′→5′方向则与复制叉移动方向相同，请问下臂是怎样完成复制的？

下臂片段（以 5′→3′片段为模板）的 DNA 合成是以长度为 100～1 000 个核苷酸的片段，以与复制叉移动相反的方向进行。这些新合成的短片段称为冈崎或新生片段。图 16－11 为两臂合成的示意图。

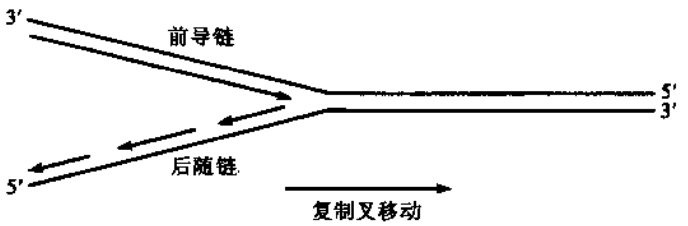


图 16－11　复制叉上一个臂的 DNA 以新生或冈崎片段合成

那些冈崎片段最终连接在一起。在复制叉上新链装配的全部途径被称作不连续 DNA 复制。

与复制叉移动方向相同的连续合成的链为前导链，另一条称为后随链。

问题：冈崎片段是怎样开始的？

移动时，它促进了引发酶以一定的间距制造短的 RNA 的作用。后随链以与复制叉移动的相反方向通过 DNA 聚合酶 III 全酶延伸。当 DNA 聚合酶 III 到达邻近片段的起始引物时，DNA 聚合酶 I 就代替 DNA 聚合酶 III，通过缺口平移的过程，将 RNA 除去并代之以 DNA。保留的缺口被 DNA 连接酶连接。最后，可能是 DNA 回旋酶在 DNA 的复制叉前引入负超螺旋或解除正超螺旋的作用促进了整个过程的进行。

例 16.8

DNA 复制必须是一个正确的过程。如果一个错误碱基通过 DNA 聚合酶而掺入到复制的链中将会发生什么情况？

碱基掺入的错误有可能发生，这大半是碱基拓扑异构体瞬间存在的结果（第 17 章）。如果在通过 DNA 聚合酶插入一个新的核苷酸的瞬间，模板上的碱基变为它的很罕见的拓扑异构形式，这种形式的碱基配对专一性发生改变，那么一个错误的核苷酸就掺入了链中。例如，一条链中的鸟嘌呤被与烯醇式胸腺嘧啶配相对的腺嘌呤代替。

DNA 聚合酶 I 的 3′→5′外切核酸酶活性至少具有校正这些错误的功能。在错误碱基掺入后，DNA 聚合酶 I 将不与模板上的拓扑异构碱基以氢键结合，一旦拓扑异构碱基出现将立即转变为更稳定的形式。3′→5′外切酶活性表明 DNA 聚合酶 I 对翻口末端或非氢键结合末端的高度选择以及在链进一步延伸之前将错误掺入的核苷酸切除的能力。DNA 聚合酶 III 全酶也具有与其相同机制的校正潜力。

16.6　细菌中复制起始的分子事件

迄今，已发现在细菌 DNA 复制的延伸期内有许多酶和蛋白质的参与，其中一些为具有多种功能的复合物，例如 DNA 聚合酶 III 全酶。复制起始也利用了几种蛋白质，这些蛋白质的基因突变对鉴别这些蛋白质非常有帮助。

例 16.9

特别是温度敏感突变型，对帮助阐明参与复制的许多蛋白质均非常有价值。几种这样的蛋白质已论述过。温度敏感突变型在某一温度下产生影响，如，42～47℃，而在 30℃或 30℃以下没有影响。影响复制的突变型称为 *dna* 突变型。已经在 *E. coli* 中确定的许多突变是为在复制叉上与生长的 DNA 链结合的各种蛋白质编码。例如，基因 *dnaG* 编码我们已讨论过的引发酶（DnaG 蛋白）。但是，另一些基因如 *dnaA*、*B* 和 *C* 编码的蛋白质参与或只参与复制周期在 *oriC* 的起始。

问题：由于相关蛋白质的作用而导致复制在 *oriC* 序列中开始，我们应该怎样理解 *E. coli* 中的 *oriC* 序列？

oriC 所在位点由一个独特的含有许多元件的 245 个 bp 的序列组成，如图 16－15 所示。这些元件包括四个含有 9bp 的片段，称作 DnaA 框，它们能使 *oriC* 序列识别和结合于 DnaA。三个位于 *oriC* 的一端的富含 AT 的 13bp 的片段，它们使 DNA 在复制起始过程中“展开”，并为 DnaB 和 DnaC 提供了进入点。*oriC* 区及其邻近区域也含有大量的能被甲基化的 GATC 位点。为简单起见，并未在图 16－15 中显示它们。它们在细胞周期的恰当时间之前阻止复制在 *oriC* 的再起始。

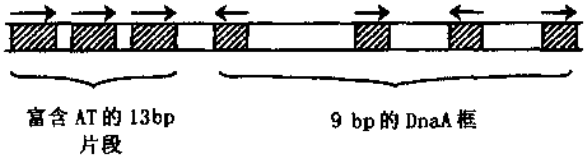


图 16－15　245bp 的 *oriC* 序列的特征。箭头代表了每种情况片段的定向

DNA 螺旋的解旋

DNA 的两条链相互缠绕形成螺旋，迄今还未见有关这些链必须解旋以使复制模板显露的详细讨论。解旋 DNA 的主要形成途径是通过解旋酶作用而实现，解旋酶使解旋的双螺旋 DNA 与水解的 ATP 相结合。*E. coli* 有几种不中的解旋酶，其中一种 DnaB 很特别，在染色体的复制期间主要是它将 DNA 解旋。DnaB 在复制复合物的前沿延 5′→3′模板链移动。解旋也可能以其他方式进行：通过在复制叉前的单链 DNA 结合蛋白（SSB）与 DNA 的结合以及通过回旋酶将负超螺旋（第 7 章）引入这个区域。

问题：SSB 与 DNA 相互作用的性质是什么？

SSB，也称为解螺旋蛋白，它与单链 DNA 紧密并协同地结合，即当一分子 SSB 蛋白与 DNA 结合时，它促进了 DNA 分子与更多分子 SSB 相结合。DNA 不是静电结构，而是瞬间和局部的链不断分离的结构。因此，通过与瞬间的单链区域的协同结合，SSB 确实能够降低 DNA 的解链温度。换句话说，SSB 帮助 DNA 分离为其成分链。除解旋外，SSB 还有其他功能。与 SSB 蛋白相结合的单链是 DNA 聚合酶作用的更快加工的模板，这对更有效地促进 DNA 链的生长是一个重要因素。

问题：DNA 回旋酶的作用机制是什么？

DNA 回旋酶属于拓扑异构酶的一种。通过催化 DNA 链的断裂和闭合，拓扑异构酶将一种拓扑形式（拓扑异构体，第 7 章）转变为另一种形式。拓扑异构酶有两种类型：只切断双链 DNA 中的一条链的拓扑异构酶 I 和切断 DNA 两条链的拓扑异构酶 II。DNA 回旋酶是拓扑异构酶 II 中的一例。

拓扑异构酶 I 催化负超螺旋 DNA 的松弛，不需要共反应物。拓扑异构酶 II 催化 DNA 形成负超螺旋，以 ATP 为共反应物，它也可以松弛正超螺旋（第 7 章）。

DNA 的拓扑异构形式对 DNA 的复制很重要，其作用主要是将负螺旋引入 DNA，这样有助于叉的解旋。同样在像细菌染色体那样的闭合分子中，复制叉的解旋导致正超螺旋位于 DNA 复制叉之前，这就阻止了 DNA 的进一步解旋。DNA 回旋酶除能松弛正超螺旋外，还具有诱导形成负超螺旋的能力。

例 16.7

图 16－14 是一个模型，它总结了前述有关蛋白质和酶参与的大多数事件。前导链通过 DNA 聚合酶 III 全酶以一个连续方式合成，SSB 与通过非复制双螺旋的解旋而得到的单链模板的结合能够促进 DNA 聚合酶 III 全酶的作用。非复制双螺旋的解旋是由与 5′→3′模板结合的解旋酶 DnaB 而完成。后随链以短片段（不连续）进行合成。当 DnaB 沿着 5′→3′模板

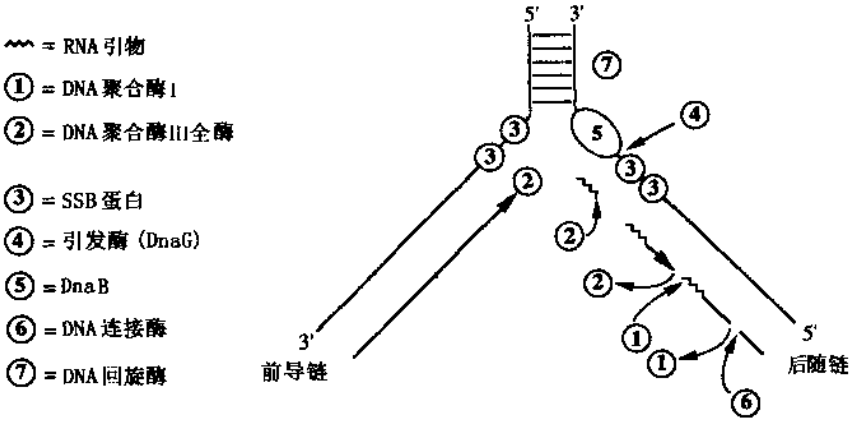


图 16－14　DNA 链在复制叉生长的有关事件

问题：为什么有六个复制终止子是必要的？

许多时候，复制叉在 TerC 附近的区域相遇和融合。TerC 是最经常利用的终止子，可能是因为在逆时针复制叉到达 TerA 之前，顺时针复制叉就已到达 TerC。当 TerA 或 TerC 终止失败后，最靠近旁侧的终止子就作为后盾发挥作用。

问题：将复制叉限制在终止区域融合的优越性是什么？

这个问题目前还不清楚。但已知在复制完成之前，两条子染色体还以共价二聚体形式或通过终止区域相互缠绕而连接在一起。染色体的分开需要特殊的酶（重组酶和一个端粒酶）参与，而这些酶也依赖于两条染色体的分离运动。如果复制叉在限制性终止区域相遇和融合时，染色体的分离可能更有效。

16.8　真核生物 DNA 复制的起始、延伸和终止

在细菌中，在复制起点参与起始和在复制叉参与 DNA 链生长的许多蛋白质和酶与它们的副本（counterpart）有同样的生化活动。但是，对终止子和终止蛋白的情况还不太清楚，而且它们是否存在任何程度对独立的复制子或聚集的复制子的描述（delineate）也不知道。但是在真核生物的染色体中，存在一个被称作端粒的特殊机制来复制它们的末端。

问题：真核生物染色体复制起点的结构特征是什么？起始是怎样完成的？

许多有关这方面的研究进展是在研究酵母菌酿酒酵母的染色体中获得的。现已确定酿酒酵母染色体的序列在插入质粒时仍能起始复制，这些序列被称作自主复制序列（ARS）。它们可能至少代表了真实的复制起点。据推测，在这些起点的起始机制与细菌中已阐明的相似。

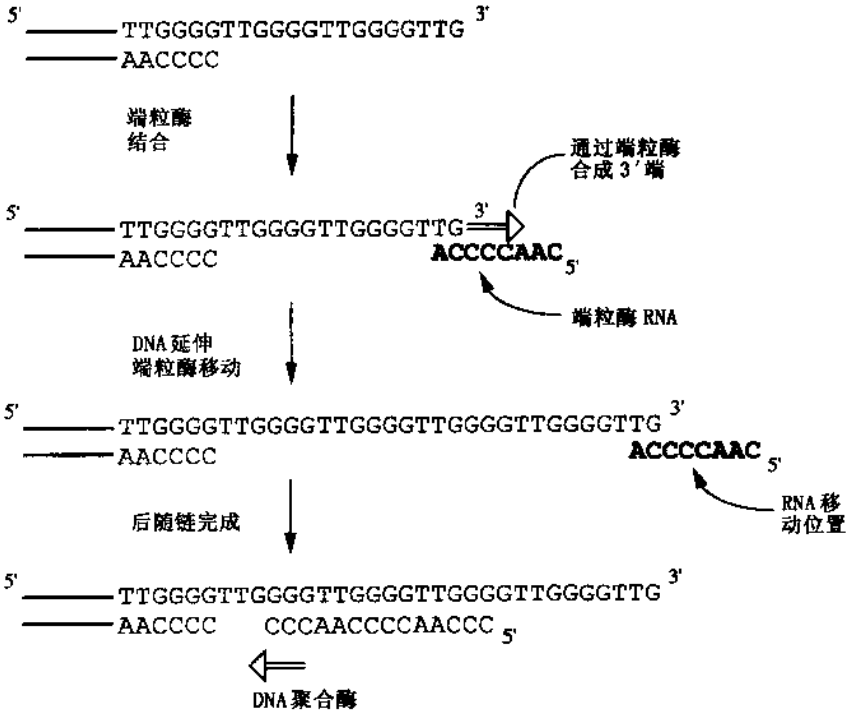


图 16-17　一条真核生物染色体通过端粒酶进行的末端复制

问题：参与在 *oriC* 的复制起始过程的蛋白质和其他因素是什么？

与延伸过程中冈崎片段的起始不同，在 *oriC* 的起始需要 RNA 聚合酶（与引发酶相反，它对利福平敏感，见第 17 章）和 DnaA、DnaB、DnaC 以及似组蛋白蛋白质 HU。RNA 聚合酶的作用被认为是产生 *oriC* 的转录活性。据推测，它促使多分子步骤进入成功的复制起始过程。

例 16.10

可能是 DnaA 引起细胞在细胞周期的适当阶段开始起始过程。DnaA 与 ATP 结合，10－20 个 DnaA-ATP 单体与 HU 共同接合于 DnaA 框，导致 *oriC* DNA 将 DnaA-ATP 多聚体包裹起来，这就会引起跨越三个富含 AT 的 13bp 的片段的解链。接着 DnaA 就引导与 DnaC 组成复合物的 DnaB 进入解链区域，并且 ATP 水解为 ADP。在 SSB 和 DNA 回旋酶存在的情况下，DnaB 解旋酶将 DNA 双向解旋，这为 DNA 聚合酶 III 全酶和 DNA 回旋酶进入开始生长的 DNA 链提供了机会，从而产生两个（双向的）复制叉。

16.7　细菌染色体复制的终止

在 *oriC* 产生的两个复制叉必定最终相遇并且融合，从而产生两条完整的新染色体。复制叉在终止区域相遇，有一个特殊的机制保证它们不在这个区域外相遇。

问题：复制叉相遇和融合限制在终止区域所依赖的是什么机制？

E. coli 染色体的终止区域大约为其总长度的 25%，在这个区域分布着六个 DNA 终止子序列（Ter-A-F），每个为 23 个 bp。它们分为相对的两组，每组含三个，如图 16－16 所示。终止区与称作 Tus（用作终止的物质）的终止蛋白具有高亲和性。当一个复制叉从一端靠近终止区域而另一个不动时，Tus-Ter 复合物便能阻止复制叉的移动。与 TerB、C 和 F 结合的复合物能抑制顺时针方向移动的复制叉的运动，但 TerA、D 和 E 的复合物却不能，它们只能抑制复制叉的逆时针方向移动。因此，六个终止子组成了一个复制叉陷阱，它只允许一个复制叉进入终止区域却不允许其离开。

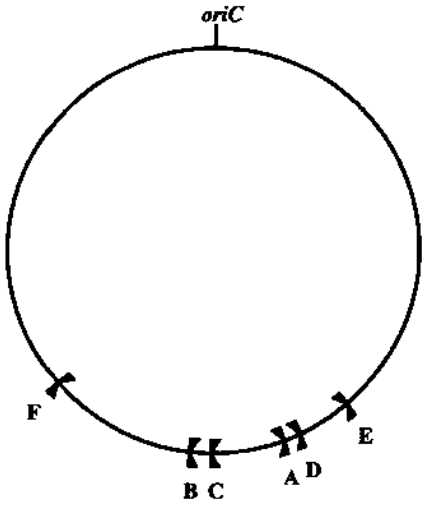


图 16－16　*E. coli* 染色体上复制终止子的定位

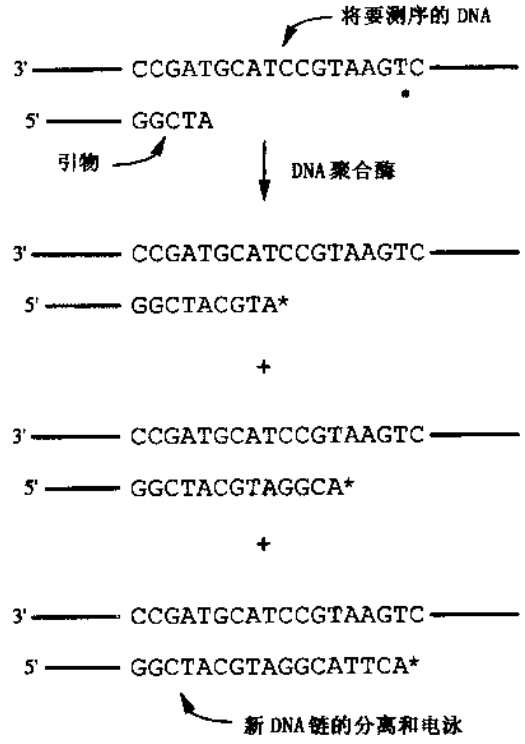


图 16－18

在变化位点的终止对应于与哪一种核苷酸结合，而这个核苷酸由含有的 ddNTP 决定。现已建立四种完全反应（底物加酶），每一种只含有一种核苷酸。因此，对于一个使用 ddATP 的反应，其合成将按图 16－18 进行。新链的长度变化可通过凝胶电泳进行分析（第 4 章）。根据所收集的由使用每一种 ddNTP 而产生的不同链的长度，就可确定核苷酸序列。

与复制蛋白质结合的抑制剂

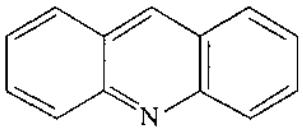
芳香肼基嘧啶是革兰氏阳性细菌（*E. coli* 为革兰氏阴性细菌）来源的 DNA 聚合酶 III 的有效抑制剂。这些化合物主要与聚合酶和 DNA 模板形成三元化合物。

阿非迪霉素是一种四环双萜类化合物，它是哺乳动物核 DNA 聚合酶的有效抑制剂。但它对线粒体 DNA 聚合酶没有影响。

由于萘啶酮酸和新生霉素分别与 *E. coli* 回旋酶的 A、B 亚基结合，因而它抑制回旋酶的作用及 DNA 复制。

例 16.13

吖啶类药物已用于治疗严重的寄生虫病。吖啶的结构为：



吖啶

问题：对于真核生物中在复制叉上DNA链生长过程的有什么了解？

在本质上，真核生物中复制叉的结构与细菌中的相同。链的生长在前导链中为连续而在后随链中不连续，并且有相同的聚合酶、解旋酶、引发酶和SSB等，但也有一些明显的区别。例如，真核生物有两种与细菌不同的DNA聚合酶，DNA聚合酶δ和DNA聚合酶α，它们分别作用于前导链和后随链。另外，在线粒体中有它自己的DNA聚合酶。

问题：真核生物染色体的末端有什么特殊？它们是怎样复制的？

真核生物染色体的末端（端粒）具有一个特殊和独特的结构。因为在复制叉后随链的不连续复制涉及RNA引物的形成和去除，因此对一个复制叉而言，不可能正确复制线性双链DNA的末端。但由于末端有一个重复的（上百个）富含GC的六聚体序列以及一个末端复制的专有机制而解决了上述问题。一种特殊的酶——端粒酶，含有一个RNA分子，此RNA分子能为富含G的5′→3′链的延伸提供模板，如图16-17所示。据推测，当3′端延伸完成时，后随链也被DNA聚合酶复制完成，这个DNA聚合酶含有引发酶作为其亚基。因为端粒酶由很多串联重复单位组成，因此如果从一条染色体到另一条染色体的端粒酶变化数目精确，那么端粒酶就没有什么重要性可言。

例16.11

真核生物中的DNA在核小体单位中与组蛋白紧密结合（第7章）。很显然，新的核小体必须由复制的DNA装配。组蛋白的合成在S期，而新DNA装配为核小体紧接在复制之后。一些证据表明亲本组蛋白八聚物能迅速从一个前进的复制叉前转移到新复制的DNA上。从前认为亲本八聚物只转移到一条新的子代双链DNA上，但现在这还是一个有争论的问题。

16.9 DNA复制的抑制剂

DNA复制的抑制剂在治疗各种疾病时很有价值，它们分为几种类型：

核苷酸生物合成的抑制剂

例如氨甲蝶呤和氟脱氧尿苷酸为核苷酸生物合成的抑制剂，它们干扰了dTTP的产生，这已在第15章讨论过。

与DNA模板相互作用的抑制剂

放线菌丝素D是常用的一种DNA和RNA合成的抑制剂。它的平面结构能够在双链DNA堆积的碱基对之间与它们非共价结合，这即是插层反应。在这种情况下，DNA就成为劣质模板。相似作用的化合物还有吖啶和乙锭，它们影响了DNA复制的忠实性。

核苷酸类似物抑制剂

许多核苷酸类似化合物在复制叉阻止了DNA链的进一步生长。2′,3′-双脱氧核苷酸能转变为核苷酸三磷酸（ddNTP）。在细菌中，它们将与生长的DNA链的3′-羟基末端结合，因为新的末端缺乏3′-羟基，所以链就不可能进一步延伸。在Sanger双脱氧方法中，利用它们以及DNA聚合酶I测定DNA的序列。

例16.12

决定DNA序列的Sanger双脱氧方法是通过一种DNA聚合酶（DNA聚合酶I已在前面提及）复制DNA的一条单链而产生新链（为了识别的目的而进行放射性标记），通过一个双脱氧核苷酸结合在3′端使新链的合成在某一位点终止。与单链模板一个末端序列互补的短的引物往往从一个固定位点开始合成。

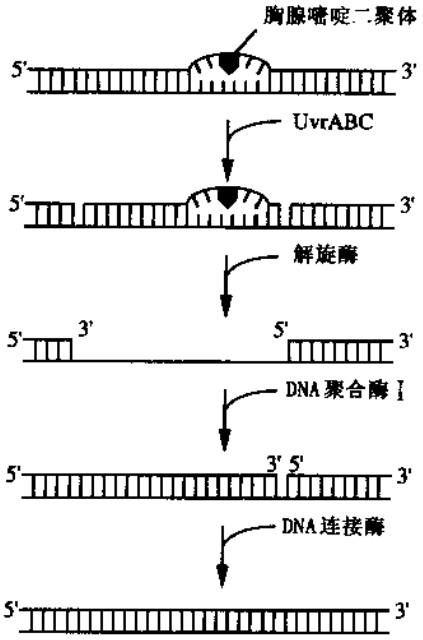


图 16－20　uv 诱导的 DNA 损伤的切除修复过程

问题：损伤的 DNA 是怎样修复的？

在切除修复中，损伤的部分被切去并代以新的 DNA。我们对 *E. coli* 中的切除修复过程了解得很清楚，其过程总结于图 16－20。*E. coli* 的切除修复一共有四个步骤。首先，三个蛋白质的复合物 UvrABC 识别损伤区域并在单链损伤部位的两侧分别被切口，将 12～13 个核苷酸从切割的单链上分离。损伤片段由于解旋酶的作用而被除去。缺口将通过 DNA 聚合酶 I 的作用填充并在连接酶的作用下将切口连接。

例 16.15

哺乳动物中的切除修复机制与 E. coli 中的相似。这种切除修复的遗传缺陷能导致着色性干皮病，这种病的病人对日光非常敏感，并最终导致皮肤癌。

问题：切除修复是校正 uv 诱导的 DNA 损伤的惟一方法吗？

不是，二聚体也可以直接通过酶的光复活作用而修复。光复活酶与 DNA 的二聚体区域结合形成一个吸收可见光并催化二聚体间共价键断裂的复合物。光复活作用在细菌细胞和哺乳动物细胞内均存在。

16.11　DNA 重组和基因分离

随着 DNA 重组技术的发展，分离特定片段的 DNA（有时包含一个基因或一个基因的一部分）、详细地分析它们的结构以及其他性质就成为可能。

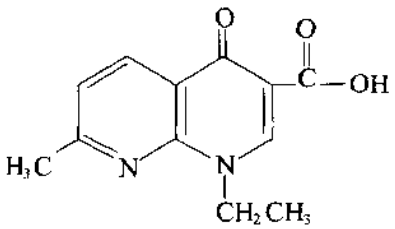
这对于在精细的分子水平上了解基因材料的复制和表达方面有非常重要的进展。

重组 DNA 是一种含有不同生物体 DNA 片段的人造分子。如果其中的一个片段携带复制起点，重组或接合分子就具有在识别这个起点的生物体内复制的潜力。在这样一种情况下，携带起点的、能够复制的片段即指载体。

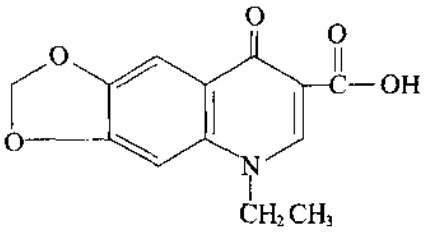
例 16.16

重组 DNA 分子可通过几种方法得到。其中最常用的一种是利用像 EcoRI 那样的 II 型限制性内切核酸酶作用产生的 DNA 片段的单链末端。这种酶产生的片段含有重叠的 5′末端（第 7 章）。在合适的温度和离子强度下，这些短的单链末端自动地通过碱基互补配对原则与另一些片段连接，这个过程成为退火（图 16－21）。重组连接的分子依靠四个碱基对而结合，但每一条链上都有一个切口，它们可被连接酶连接。

萘啶酮酸是临床上使用的抗菌剂，而草喹酸与之作用方式相同但效果比前者高十倍。这两种抗生素的结构为：

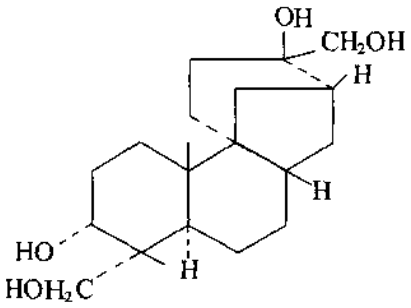


萘啶酮酸



草喹酸

阿非迪霉素曾用于眼睛疱疹病毒感染的治疗。它的结构为：



阿非迪霉素

16.10　DNA 损伤的修复

大量的因素可导致 DNA 的损伤，包括紫外线、电离辐射和各种化学试剂。损伤的分子能对机体造成伤害甚至致死，但存在很多机制能够消除这样的损伤。目前了解最清楚的为紫外线导致损伤的切除修复。

例 16.14

在紫外线作用之下，DNA 链的相邻嘧啶碱基核苷酸发生共价交联。这种交联通常发生在两个胸腺嘧啶之间，这两个胸腺嘧啶形成胸腺嘧啶二聚体（图 16－19）。胸腺嘧啶二聚体导致 DNA 链的扭曲变形并表现出对 DNA 复制和转录的物理阻碍。

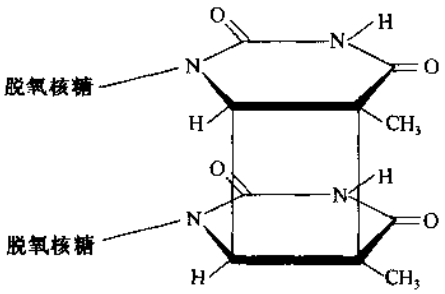


图 16－19　胸腺嘧啶二聚体的结构。二聚体在脱氧核糖的两个位点上连接，请注意其环丁烷结构

16.12 聚合酶链反应

问题：怎样能获得足够的特定 DNA 的样品以测定其性质?

可以通过使用聚合酶链反应（PCR）而完成。

PCR 提供了一种大量产生特异 DNA 序列的双链拷贝的途径。获得的拷贝典型的长度为 1kb，但经过特异性修饰，能得到更长的反应产物。

聚合酶链反应要用到：①一种耐热的 DNA 聚合酶，例如耐热的栖热水生菌来源的 Taq 聚合酶；②将要扩增的 DNA 模板；③两个引物，每个大约 20 个核苷酸并且能与靶互补链的不同部位退火，以及作为 DNA 聚合酶作用的开始位点；④一种包含四种脱氧核苷三磷酸 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP、Mg^{2+}、盐和 pH 缓冲液的溶液。

PCR 利用聚合酶产生与你感兴趣的 DNA 区域相应的 DNA 互补拷贝。为了指导酶进行正确的序列反应，PCR 依赖于引物与靶单链 DNA 互补序列的退火。DNA 聚合酶不能重新开始 DNA 的合成，只能从退火引物开始延伸 DNA 链。反应混合物中过剩的引物为扩增产物的产生提供了充足的原材料。

PCR 反应包括高温下循环利用聚合酶，高温将导致不耐热酶的变性，因此，经常并典型使用的为一种耐热的 DNA 聚合酶，即 *Taq* 聚合酶。

PCR 仅有三个步骤，①双链 DNA 的变性；②DNA 退火和③DNA 延伸。在设计好的机制即热循环周期中，每一个步骤通常在不同温度下进行。

链式反应中的一个典型步骤仅需几分钟，所有三个步骤为一个循环周期。每个循环周期将产生大约两倍的靶 DNA 分子，如下所示。典型的 PCR 反应将进行超过 30 个循环。如果每一个周期假定产生双倍的靶序列拷贝，那么经过 30 个周期将产生上亿个（$>10^9$）特定序列的双链 DNA 拷贝。

在变性步骤中，将双链靶 DNA 加热到 95℃将链分离，提供单链靶 DNA。

在退火过程中，将反应混合物冷却使引物与每条链的特定位点退火（结合）。引物需要实验者（以及自动化 DNA 合成仪）仔细选择以使它们与靶序列互补，退火温度依赖于序列中碱基的组成。通常温度选择在 50℃左右。两个引物与相对的链退火，与扩增的序列相接，通常（并不总是）扩增序列不超过几个 kb。正是这些引物决定了 PCR 的特异性。如果选择不同的序列作为引物，那么就会得到扩增的其他靶序列。

延伸过程往往在 72℃进行。*Taq* 聚合酶以模板依赖方式延伸每一个引物的 3′羟基末端。最终的产物为双链 DNA 产物，其中一条链为模板，另一条链为新合成链。如果反应少于几分钟，那么合成的 DNA 往往少于几个 kb。这表明引物位点分离的选择，因为如果指数扩增连续进行，那么任何扩增材料必须包含一个允许与第二个引物退火的位点。

例 16.17

图 16－23 说明一个样品 DNA 序列的变性、退火和延伸过程。5′→3′端已标明，引物位点中间的序列以一系列破折号代表。

一个双链 DNA 分子（图 16－23 的上部）事实上是由任意序列组成，其序列长度可变（以破折号表示），并且 PCR 能产生这个 DNA 分子的许多拷贝。DNA 通过提高温度而变性，接着引物与将要扩增的区域的相邻序列退火。退火温度与寡核苷酸序列有关，如果两个引物的 G＋C 含量大致相同，那么退火发生于相同的温度。每一个引物有一个暴露的 3′端，这个末端通过 *Taq* DNA 聚合酶而延伸，并完成每一条单链模板的互补链的合成。这个过程（称作周期）就会重复很多次。重复循环导致产生精确长度的双链 DNA 的扩增产物，其长度为两个引物的 5′末端的距离。

例 16.18

图 16－24 表明参与两个周期的 PCR 的双链 DNA 产物的产生步骤。每一条 DNA 链和引物用实线表示。通过重复三个步骤的循环过程（变性、退火和延伸），PCR 产物以指数形式

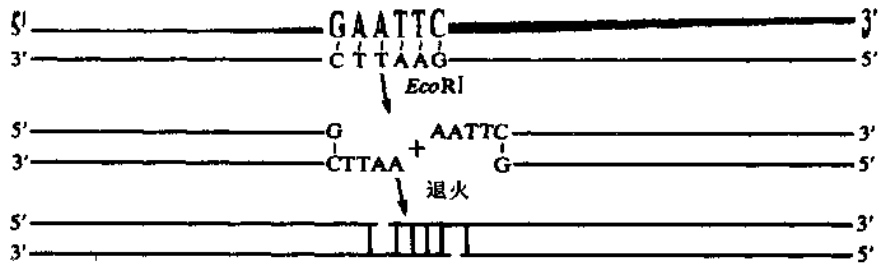


图 16－21　通过由 *Eco*RI 产生的重叠末端的碱基配对完成的 DNA 退火

问题：DNA 片段是怎样连接到适合的载体上的？

最常使用的载体为细菌质粒。它们是 3～100kb 的小的环状 DNA 分子。环状对它们的复制非常重要。如果一个质粒只有一个 *Eco*RI 的酶切位点，获得的线性分子就可与通过 *Eco*RI 酶切的其他 DNA 片段退火，这样就产生了一个由 DNA 连接酶连接的环状接合分子（图 16－22）。环状接合分子可通过转化而引入合适的宿主例如 *E. coli* 中，这个过程涉及在低温下用 $CaCl_2$（允许 DNA 的吸收）处理细菌细胞、以及随后在合适条件下温育 DNA。在载体控制下，外源 DNA 就可复制。如果外源 DNA 携带了一个完整的基因，这个基因就可能在细菌中表达。人类胰岛素在细菌细胞中的大量生产就是通过这种方法实现的。有时，上述全部技术即指基因克隆。

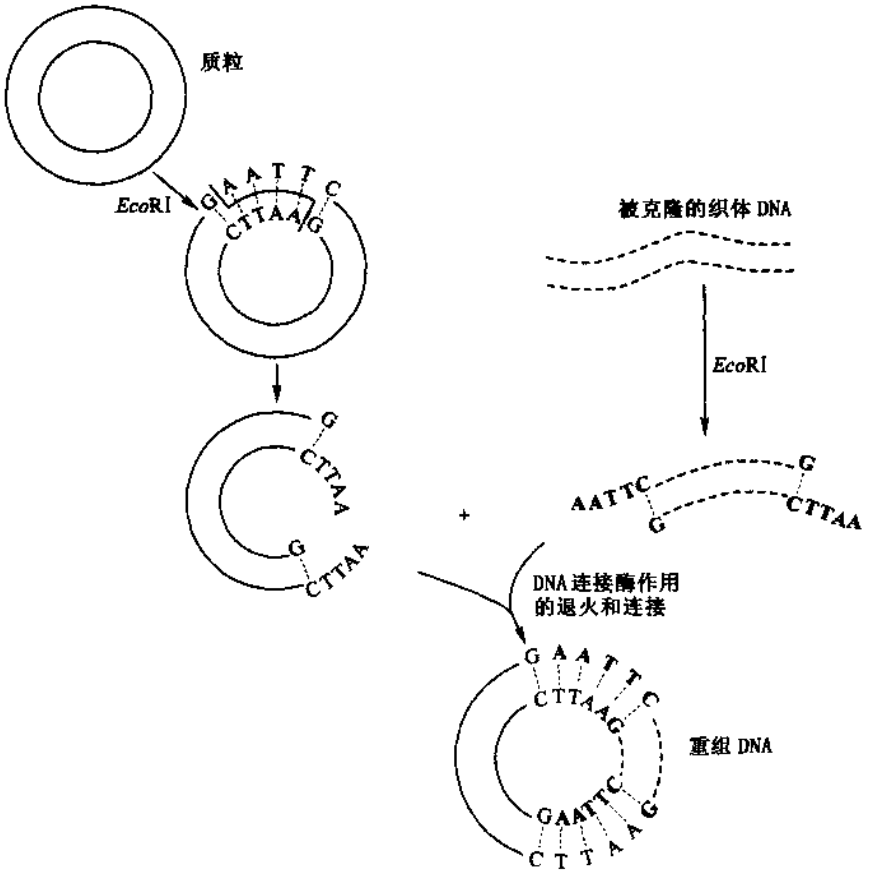


图 16－22　一个接合或重组 DNA 分子的形成步骤

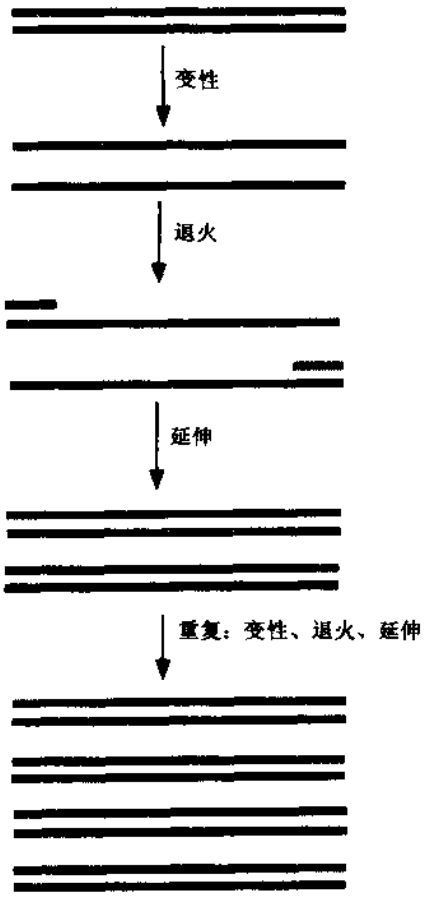


图 16-24　PCR 反应

问题解答

DNA 的半保留复制

16.1　当应用于 DNA 复制时，模板的定义是什么？

答：

模板是与各种复制酶直接结合的 DNA 链，同时也是决定新合成 DNA 链序列的 DNA 链。

DNA 双链自身不能进行复制。DNA 必须解旋为它的组成单链，在这些单链中核苷酸序列通过碱基配对而复制。

16.2　一个线性双链 DNA 分子经过连续 5 代复制后，原始 DNA 占总 DNA 的比例是多少？

答：

每一代 DNA 的量都加倍。因此，连续 5 代后 DNA 量将是原始 DNA 的 32 倍（25）。因此，原始 DNA 占总 DNA 的 3.125%。

16.3　对于问题 16.2 中的情况，原始 DNA 分子怎样在后代分子中分配？

答：

后代由 32 个分子组成。原始（或亲代）DNA 分子的两条单链仍保持完整。每一条分别为两个后代双链 DNA 分子中的一条单链。

上升。

PCR 方法经常用于小量原始靶序列的检测或分析。因此，PCR 对于快速鉴别传染介质如病毒和细菌非常有用，在法医工作中，证据样品可能非常有限，在研究中，特异性 PCR 产物可于测序并可用于某些特殊目的。RNA 也可通过提供一种反转录步骤（将 RNA 复制为 DNA）产生互补的 DNA 而应用 PCR 进行检验。

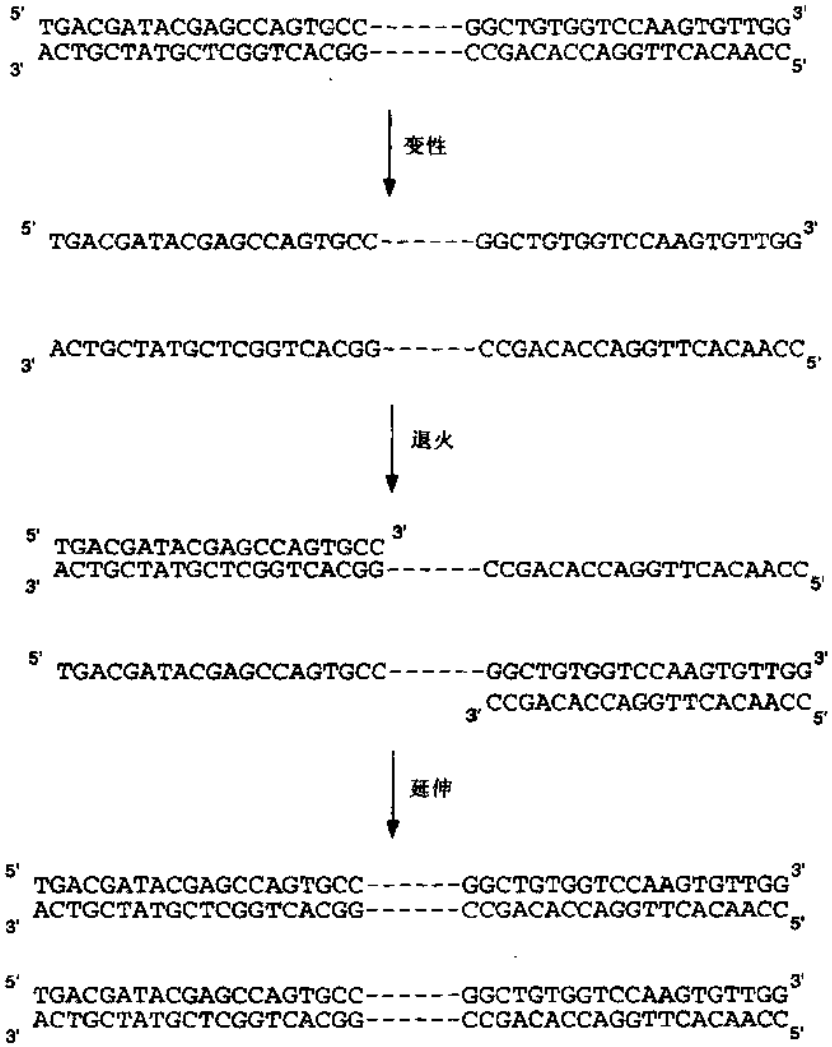


图 16－23　PCR 中的变性、退火和延伸过程

问题：如果引物不能结合到靶 DNA 序列上，那么 PCR 扩增还能进行吗？

引物的退火非常重要，因为这个过程决定了 PCR 反应的特异性并确定了将要扩增的 DNA 序列。如果两个引物均没有与靶序列结合，DNA 聚合酶就不能延伸 DNA，因此 DNA 也不能合成。如果仅有一个引物与靶序列结合，那么扩增也不会以指数形式进行。如果 PCR 成功，必须两个引物均与靶序列结合。

问题：为什么 PCR 中要使用耐热的 DNA 聚合酶？

通过一定范围的高温循环操作，许多常用的实验室酶就会变性。当在最高温度（95℃）下分离两条 DNA 链时更是这种情况。如果一种 DNA 聚合酶不是耐热的，这个酶就会变性。耐热性 DNA 聚合酶能够从在高温下生长的生物体如细菌－栖热水生菌中分离到。

答：

由一条多肽链组成的聚合酶 I 包含三个不同的活性位点，分别为聚合酶、5′→3′外切核酸酶和 3′→5′外切核酸酶。每一种活性都具有一个重要的生物学作用。5′→3′外切核酸酶活性可通过酶的蛋白水解断裂作用与其他两个位点分离。

16.12　构成 DNA 聚合酶 III 核心酶的是什么？

答：

DNA 聚合酶 III 在细胞内为 10 条多肽链组成的功能性复合物，即全酶。其亚复合物含有其中的三条多肽链（α、ε 和 θ），它们能迅速分离并展现聚合酶的活性，它们被称作为 DNA 聚合酶 III 的核心酶。

16.13　我们能从不连续的 DNA 复制领会到什么？

答：

DNA 链的生长发生在复制叉的两条子臂上。在一条臂上，链的生长为连续的（5′→3′），与复制叉移动方向相同。在另一条臂上，链的生长以分离的短片段（5′→3′）进行，并与复制叉移动的方向相反。短片段（新生或冈崎片段）最终连接。后一种复制即为不连续的 DNA 复制。

16.14　DNA 复制中的术语前导链和后随链的含义是什么？

答：

前导链是连续合成并与复制叉移动方向相同的链。后随链为不连续合成即以短片段合成最终相连接并与复制叉移动方向相反的链。

16.15　*E. coli* 的 DNA 聚合酶 I 的 3′→5′外切核酸酶的作用是什么？

答：

它具有校正作用。不正确的碱基（以核苷酸的形式）能以任意的低频率插入生长的 DNA 链中。这是四个碱基稀有的拓扑异构形式存在的结果，如果当一个新来的核苷酸插入链的瞬间，模板中的碱基变为其拓扑异构形式，就将导致碱基配对的错误。当模板核苷酸又转变为它的主要形式，就产生碱基对错配的结果。3′→5′外切核酸酶能够识别错配碱基对并在链延伸之前催化错误核苷酸从链的末端水解除去。

16.16　DNA 聚合酶的一个特殊的特征是没有起始一条多核苷酸链合成的能力，它们仅能延伸一个已存在的链。不连续合成的 DNA 链的新生片段是怎样起始的？

答：

与 DNA 聚合酶不同，RNA 聚合酶能以 DNA 为模板（第 17 章）起始合成一条新的 RNA 链。DNA 聚合酶能够从一个 RNA 引物延伸 DNA。在不连续 DNA 链的生长中，在复制叉开始前进的过程中螺旋解旋的同时，*E. coli* 中的一种称作引发酶的特殊类型的 RNA 聚合酶以相当规则的碱基间距放置短的 RNA 引物。这些引物参与了 DNA 聚合酶催化的新生 DNA 链合成的起始。

16.17　在 *E. coli* 中的整个复制过程中，DNA 聚合酶 I 的 5′→3′外切核酸酶活性的功能是什么？

答：

后随链在复制叉以不连续 DNA 合成方式而装配新 DNA 链的过程中，DNA 聚合酶 I 起到重要作用。DNA 聚合酶 III 负责每一个新生 DNA 片段的大量合成。通过 DNA 聚合酶 III 而生长的链中，当 5′RNA 引物与邻近的 DNA 片段相遇时，聚合酶 I 就接替 DNA 聚合酶 III 发挥作用，它可通过 RNA 引物区域继续 DNA 链的延伸。这种情况下，通过 DNA 聚合酶 I 的 5′→3′外切核酸酶活性将 RNA 片段切除。

16.18　DNA 连接酶催化的反应是什么？它在 DNA 复制中的作用是什么？

答：

DNA 连接酶催化两个 DNA 片段的共价结合。双链 DNA 在相邻的 5′-磷酸基团和 3′-

DNA复制的拓扑学

16.4 一种复制的细菌染色体以称作q的结构（因其在电子显微照相中的形状和图解）存在，其上部闭合部分代表复制部分，或复制泡。为什么现在复制的起点位于泡的每个臂的中间？

答：

细菌染色体的复制在某一独特的位点开始，即起点。复制叉以几乎相等的速率从这个位点分开。最终，起点完全复制并且每一个子代的起点仍保留在复制泡的中部。这与单向复制相反，后者仅有部分起点被复制，并且当复制叉移动离开时，起点位于静止的复制叉上。

16.5 环状细菌染色体和线性真核生物染色体在复制拓扑学上有何不同？

答：

主要区别在于细菌染色体复制只有一个起点，而真核生物染色体有多个起点。这导致前者产生单个复制泡，而真核生物染色体产生串联排列而聚集的泡。在细菌中，从一个起点开始的两个复制叉在终止区域相遇，而在真核生物中相遇的两个复制叉是从相邻的起点开始。

DNA复制的调控

16.6 细菌在什么条件下产生多叉染色体？

答：

多叉细菌染色体是含有超过两个复制叉的染色体，它是在复制泡中子染色体起点重新开始复制的结果。在这种情况下，复制周期可在更短的时间内完成，且代时将更短。这种情况通常发生在由营养富集培养基诱导的快速生长条件下。

16.7 在什么条件下，真核生物的部分染色体以多叉结构存在？

答：

与细菌中的情况不同，真核生物染色体中的多叉结构并非因提高DNA复制速率而形成。但是，多叉DNA仅在真核染色体中的限制性区域出现，它导致DNA（或基因）的扩增，且仅发生于特殊情况下。

16.8 细菌中染色体的复制可分为三个阶段，其中哪一个阶段对控制整个过程非常重要？

答：

细菌中DNA复制的三个阶段为起始、延伸和终止。复制的控制受起始水平的影响，因此，起始频率决定了复制周期的完成频率。即使复制的整个速率变化，复制叉移动（延伸）的速率仍保持相当的恒定。目前没有证据表明终止对复制速率有控制。

DNA复制的酶学

16.9 辨别DNA聚合酶的底物和模板。

答：

底物经过化学修饰，包括四种脱氧核苷三磷酸。模板并没有经历变化，但为核苷酸装配成链提供了序列指导。DNA合成的模板是亲代单链DNA。

16.10 DNA聚合酶I和III是以不同的机制延伸DNA链吗？

答：

不是。所有的DNA聚合酶都以脱氧核苷5′-三磷酸为添加新核苷酸单位，每次一个，添加在生长链的3′-羟基末端。DNA聚合酶I和III的主要区别在于它们是作用于复制还是DNA的修复合成。

16.11 *E. coli* 的DNA聚合酶I为一个多功能酶，这句话意味着什么？

16.24　为什么真核生物含有端粒酶，而 *E. coli* 中却没有？

答：

端粒酶对复制和维持真核生物线性染色体末端完整性有特殊作用。而在 *E. coli* 的 DNA 中没有这样的末端。

DNA 复制的抑制剂

16.25　为什么 2′，3′- ddCTP 能抑制 DNA 聚合酶 I 的作用？

答：

DNA 聚合酶 I 催化 2′，3′- ddCTP 的单磷酸添加到生长链的 3′- 羟基末端，并与模板 DNA 链的鸟嘌呤相对。生长链因此缺乏 3′羟基末端，阻止核苷酸单位的进一步添加。

16.26　2′，3′- ddCTP 将会阻止 DNA 聚合酶 I 催化的 d $(AT)_n$ 的复制吗？

答：

d $(AT)_n$ 是在双螺旋结构的每一条单链含有交替的 A 和 T 的多聚脱氧核苷酸。2′，3′- ddCTP 对 DNA 聚合酶 I 催化的这样的链没有影响，因为模板链上没有 G 残基与之相对，所以这个链末端抑制剂无法与 G 配对。

DNA 损伤的修复

16.27　DNA 复制和 DNA 修复合成的区别是什么？

答：

复制指通过完整染色体的模板 DNA 链进行复制而繁殖的过程。在这种情况下，DNA 合成为广泛的复制。DNA 的修复合成指校正分离的 DNA 的损伤（由物理或化学处理而引起）。在这种情况下，DNA 的合成限制在损伤的邻近区域，并且范围非常小。

16.28　在细菌中，在 uv 诱导的损伤的切除修复过程中，什么酶参与了去除损伤 DNA 的部分？

答：

有四个酶直接参与，它们是 UvrABC 内切核酸酶、解旋酶、DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶。第一个酶切断 DNA 链中胸腺嘧啶二聚体的两端。第二个酶将含有胸腺嘧啶二聚体的单链核苷酸片段除去。DNA 聚合酶 I 合成新 DNA 以填补切口，而 DNA 连接酶将切口连接。

DNA 的重组和基因的分离

16.29　重组质粒 DNA 分子的什么特征对其在宿主细胞中复制有重要作用？

答：

首先，重组质粒 DNA 必须携带能在特定宿主中发挥作用的复制起点。其次，重组质粒 DNA 分子必须为环状或具有环化的能力。

16.30　人类 DNA 携带为特定蛋白编码的基因的片段已被克隆到细菌细胞中，人类基因会在细菌细胞中表达吗？

答：

人类基因随着重组 DNA 载体而复制，但它不一定会表达。只有当重组分子像mRNA 那样转录并接着翻译成蛋白质时才会表达。对于转录，基因必须位于细菌启动子的附近。而成功的翻译，基因必须没有内含子（第 17 章），且其转录物必须在合适的位置含有一个细菌核糖体结合位点（第 17 章）。

羟基之间形成磷酸二酯键。换句话说，DNA连接酶能够缝合缺口。

DNA连接酶在与DNA有关的几种反应中均有重要作用。在复制中，它将后随链上新生DNA片段相连接，这个过程伴随着由DNA聚合酶I作用的以DNA代替RNA引物的过程。

16.19 什么是拓扑异构酶？它们怎样参与了DNA的复制过程？

答：

拓扑异构酶催化DNA的一种拓扑形式向另一种拓扑形式转变。它有I和II两种一般类型。前者仅切断双链DNA中的一条链，而后者两条链均可切断。细菌来源的DNA回旋酶即为II型拓扑异构酶，并且它参与了DNA的复制过程。它能够诱导DNA形成负超螺旋同样也可以松弛正超螺旋。在细菌中，复制周期的起始需要DNA解旋酶，它可能将负超螺旋引入起点，因此就能与参与起始的酶和其他因子相结合。它也能通过在复制叉前引入负超螺旋或松弛这个区域的正超螺旋而促进双螺旋在复制叉的解旋。

细菌DNA复制的起始

16.20 细菌中，通过术语复制周期的起始我们了解了什么？

答：

细菌中DNA的复制是一个循环过程，其含义是指在染色体起点（*oriC*）上，复制的起始以一定的时间间距循环完成，而时间间距依赖于生长培养基的丰富程度。大量特殊蛋白质和酶直接参与复制的起始，但并不参与DNA链的生长。一旦起始开始，即使起始蛋白质或酶缺乏，复制循环将也进行下去直到复制完成。但在这些酶和因子的缺乏情况下，将没有新的循环开始。

16.21 在细菌中RNA聚合酶和引发酶在DNA复制过程中的作用的区别是什么？

答：

这两个酶均合成RNA。RNA聚合酶受药物利福平的抑制，而引发酶不受。从*oriC*起始的复制周期可被利福平阻断，因此起始需要RNA聚合酶。而另一方面引发酶在后来的延伸或链生长阶段参与了后随链新生片段的起始。这个阶段不受利福平的影响。因此，这两个酶，尽管都是催化RNA的合成，但在DNA复制过程中的作用却不相同。

细菌DNA复制的终止

16.22 术语复制叉陷阱的含义是什么？

答：

在环化细菌染色体复制完成的终点，两个复制叉在终止区域相互靠近。它们不在终止区域以外的区域相遇非常重要。伸展的终止区域有六个能与终止蛋白结合并捕获复制叉的终止子（DNA序列）。这些终止子分为相对的两组，每组三个，复制叉只能进入终止区域但却不能离开。这种在终止区域的终止子的结构即规定为复制叉陷阱。

真核生物中DNA复制的起始、延伸和终止

16.23 为什么哺乳动物细胞内的DNA聚合酶的种类比细菌细胞中的多？

答：

在细菌细胞中，有两种不同的DNA聚合酶（δ和α）参与核DNA的复制。然而在哺乳动物细胞中，一种不同的DNA聚合酶（β）参与核DNA的复制，线粒体的DNA复制有其自己的聚合酶。

16.46　紫外线能够导致胸腺嘧啶二聚体的形成，这个能够给双螺旋 DNA 的互补链带来交叉结合吗？

16.47　在 *E. coli* 中，DNA 复制和 DNA 损伤的切除修复过程中共同作用的酶是什么？

16.48　切除修复是从 DNA 上除去胸腺嘧啶二聚体的惟一方法吗？

16.49　环状双螺旋 DNA 的什么特征对其作为 DNA 克隆载体很重要？

16.50　在 PCR 过程中，是引物还是 DNA 聚合酶对于决定扩增区域更为重要？为什么？

聚合酶链反应

16.31　为什么在一个PCR反应混合物中的两个引物最好具有相似的G+C含量?

答:

PCR的专一性依赖于对靶DNA链互补序列的精确识别。提高退火温度是调整这种专一性的一个途径，这样只有高互补性的区域能够结合。如果引物的G+C含量不同，以两种引物合成的DNA将有不同的解链温度，因此解链需在不同的严格要求下进行。

16.32　PCR怎样被用于在一段DNA序列中引入突变?

答:

在PCR的延伸期可引入错误，因为热稳定性DNA聚合酶具有特殊的复制忠实性，但在体外没有“校正”活性。除这种情况之外，通过将错误碱基掺入一个或两个引物中，PCR产物中也会引入突变。在PCR的第一个循环中，错配发生将很轻微，但作为半保留DNA合成的简单结果，接下去的产物将掺入变化的序列。

16.33　人们在学习PCR时常犯的错误是什么?

答:

人们常将引物混淆。PCR需要两个引物，并且因为要结合于相对的两条链，因此它们的序列不同。在溶液中要有大量的引物（过量），以便为每一个反应提供足够的引物。每一个PCR产物在其5′末端均有一个提供的引物。

补充问题

16.34　(a) DNA单向复制的含义是什么?(b)以滚环机制进行的复制是单向还是双向?

16.35　细胞周期的DNA合成（S）期在某些真核生物的细胞中非常短（<20min)。什么样的过程允许所有染色体DNA可以这样快速合成?(提示：与复制子的大小有关。)

16.36　*E. coli* 的DNA聚合酶I的三种酶活性在整个复制过程中均用到。请描述其各种活性在DNA复制过程中的作用。

16.37　在细菌染色体中，DNA链生长的引发发生在超过1个固定的位置，这个位置是什么?

16.38　DNA回旋酶通过何种方式帮助在复制叉上的DNA进行解旋?

16.39　DNA解旋酶是一个拓扑异构酶吗?

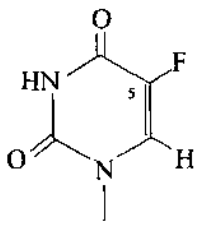
16.40　DNA链切口末端的什么特征对DNA连接酶的连接很必要?

16.41　DNA聚合酶的校正功能的含义是什么?

16.42　为在双螺旋DNA的复制起点复制泡的产生设计一个蛋白质（酶）介导的可能序列。

16.43　*dna* 突变的含义是什么?

16.44　氟脱氧尿苷酸能够阻止DNA链的起始吗?其结构为



D脱氧核糖　5′-磷酸

16.45　在细菌中，一个RNA聚合酶的抑制剂能抑制DNA的复制吗?

连在一起。

表 17.1　遗传密码的密码子-氨基酸分配

第一个位置	第二个位置				第三个位置
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	(CT)*	(CT)*	A
	Leu	Ser	(CT)*	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Prop	His	Arg	C
	Leu	Prop	Gln	Arg	A
	Leu	Prop	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Ile	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (CI)+	Ala	Glu	Gly	G

* CT = 链终止。

\+ CI = 链起始。

问题：什么是蛋氨酸的密码子?

从表 17.1 可以看到蛋氨酸的密码子是 AUG。蛋氨酸是两个只有一个密码子的氨基酸当中的一个。

问题：表 17.1 中 CI 的含义是什么?

它表示链的起始，并表示蛋氨酸的密码子（AUG）定义着一个 mRNA 上的翻译部分的开始，即蛋氨酸是第一个被组入多肽链的氨基酸。GUG 通常是缬氨酸的密码子，在少数情况下它可取代作为链起始的密码子并可组入蛋氨酸的 AUG（见表 17.1）。需要注意的是：一个新生多肽链的第一个氨基酸总是蛋氨酸（或缬氨酸），然而，蛋氨酸和缬氨酸也可出现在多肽链当中。

问题：在一个生长的多肽链的哪个末端，即 N 端或 C 端，可发现起始氨基酸?

它总是被组入 N 端，因为链的装配方向是 N→C。

问题：在形成多肽链的 mRNA 上有没有相似的定义终端位点的密码子?

实际上有三个有此功能的密码子。它们是 UAA，UGA 和 UAG；它们表示链终止（CT）三联体（表 17.1），终止密码子，或无义密码子。

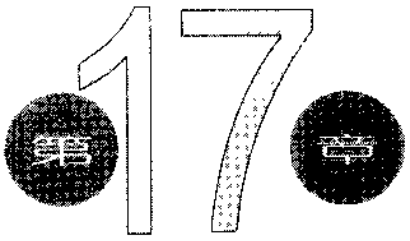
例 17.2

写出定义一个氨基酸序列为 Met-Leu-Arg-Asn-Ala-Val-Glu-Ser-Ile-Phe-Thr 的短肽的核糖核苷酸序列。

一个可能的序列如下：

5′AUG UUA CGU AAU GCU GUC GAA UCU AUU UGC UUU ACA UAA 3′

注意在此序列的开始和末尾分别存在起始和终端密码子。在把这个序列（它存在于一个较长的 mRNA 分子中）翻译为氨基酸序列的过程中，已假定密码子并不重叠。这已被实验所证实。因此，三联体遗传密码是非重叠的。



基因表达和蛋白质合成

17.1 导言

多数基因最终可表达为蛋白质（第 16 章），这一完整的过程被称为基因表达。在这个过程中，DNA 中的一段脱氧核苷酸序列（即基因）首先被转录为 RNA（信使 RNA 或 mRNA）中一段核糖核苷酸序列，进而，它又被翻译为一个限定长度多肽中的氨基酸序列。后者的氨基酸序列决定着该分子成为有生物学活性蛋白质的自我折叠方式。

在细菌细胞中，没有膜包裹着 DNA 拟核，DNA 的转录和 RNA 的翻译是在同一细胞空间进行的。在真核细胞中，核有膜包裹（第 1 章），转录发生在细胞核内，而 mRNA 必须被转至细胞质中才能被翻译。通常，翻译的最初多肽产物后来会被修饰，有时为了使其能够被转运到细胞外，这种修饰也可发生在其转运的过程中。

单链 mRNA 中核苷酸序列的装配依赖于与含有基因的双链 DNA 中的一条链的碱基互补配对原则。双链 DNA 中与其 mRNA 具有相同序列（除了 T 代替 U 以外）的一条单链称为编码链或有义链。双链 DNA 中另外一条作为转录模板的链称为模板链或反义链。有些教科书中没有如此定义“有义链”和“反义链”，因此，当涉及某一特定的链时，使用“编码链”和“模板链”也许更为合适。

遗传密码是把 mRNA 中的核苷酸序列转换为多肽中氨基酸序列的基础。遗传密码描述了可被读解为个别的氨基酸（有 20 种氨基酸）的各种核苷酸组合（DNA 或 RNA 中只有四种核苷酸）。在 19 世纪 60 年代，遗传密码的性质被阐明。

17.2 遗传密码

因为只有四种核苷酸和 20 种氨基酸，要定义每一个氨基酸至少要有 3 个核苷酸构成一个组合。基于 2 个核苷酸构成的密码只可提供 4 或 16 个组合，这是不够的。关于每一个氨基酸的密码子是由 3 个核苷酸构成的证据来自于通过对某一基因删除或添加核苷酸后对其多肽产物影响的遗传学研究。

问题：三核苷酸密码可提供 4 或 64 个密码子。额外的密码子被使用吗？

是的，它们全被使用。多数情况下，某一氨基酸有两个以上的密码子。因此遗传密码是简并的。

例 17.1

分析表 17.1 中密码子的功能分配，密码的简并性非常明显。例如：对于亮氨酸有六个密码子。要注意每一个三联体核苷酸成分被写成 mRNA 中的核苷酸（包含 A，U，C，G；见第 7 章）。第一位置表示三联体 5′端的起始核苷酸。第三个核苷酸在 3′端。5′表示这样的事实，即：在核苷酸链的这个末端，最后一个核苷酸在其核糖的 5 位碳原子上没有磷酸二酯键。3′表示这样的事实，即：在核苷酸链的这个末端，最后一个核苷酸在其核糖的 3 位碳原子上没有磷酸二酯键。在多核苷酸链的内部，相邻核苷酸的 5′端和 3′端相互被磷酸二酯键

T_{82}，T_{84}，G_{78}，A_{65}，C_{54}，A_{45}

（下标表示该碱基出现的百分数）。－10 和－35 位点之间的实际序列并不重要，而二位点间的距离是重要的；一般认为该距离对于 RNA 聚合酶的定位是至关重要的。

问题：RNA聚合酶如何识别启动子？

细菌的 RNA 聚合酶是一个分子质量为 480 000 的多亚单位的酶。四个亚单位，β，β′，α 和 σ（M_r 分别为 150 000，160 000，36 500 和86 000）的比例为 1:1:2:1，而整个复合物的更准确的名字是 RNA 聚合酶全酶。σ 亚单位直接参与启动子的识别。缺乏 σ 亚单位的复合物称为 RNA 聚合酶核心酶。在转录开始时，σ 亚单位引导全酶到启动子位点形成二元复合物，在此复合物中存在由局部解旋的 DNA 双链形成的开放启动子复合物。这是整个转录循环的第一步，称为模板结合。

例 17.3

转录循环如图 17－2 所示。

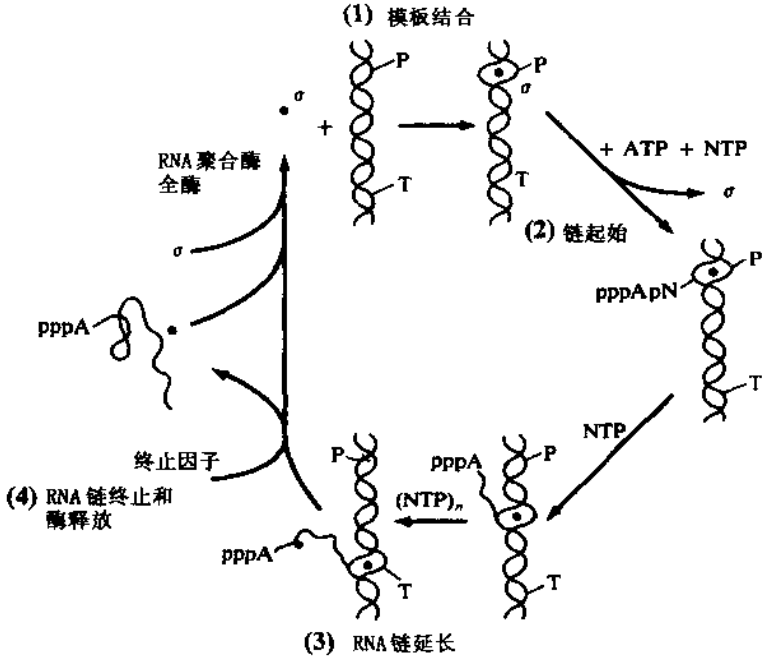


图 17－2　细菌中的转录循环。对于一个单独的 RNA 转录物，P 和 T 分别表示启动子和终止位点。pppA 表示三磷酸的 ATP

如前所述，模板结合步骤涉及全酶通过其 σ 亚单位与启动子相互作用形成开放启动子复合物。RNA 链的起始可通过在 ATP（或 GTP）和下一个核苷酸（由模板限定）之间形成第一个磷酸二酯键来进行，并产生一个二核苷四磷酸：

$$ppp\overset{A}{G} + pppN \rightarrow ppp\overset{A}{G}pN + PPi$$

接下来，σ 亚单位被释放；如有关 DNA 聚合酶的描述（第 16 章），通过核苷酸单位连续地添加到已组入的前一个核苷酸的 3′－OH 上，RNA 链被延长。当核心酶到达终止序列时，转录被终止。大肠杆菌中有两类终止序列已被确认：一类需要一个称为 ρ 的额外蛋白质来影响终止；而另外一类并不需要。终止序列相当长（长至 50 核苷酸）并通过形成单链 RNA 转录物上发卡结构而起作用。发卡结构说明存在反转重复序列，该反转重复序列可使 RNA 链自身折叠并通过互补碱基配对形成稳定结构。随着 RNA 转录物的释放，核心酶也被释放，它与 σ 亚单位相互作用后，可重新被利用于下一步转录循环。在终止位点释放的

问题：在例 17.2 所示的核糖核苷酸序列中，从第 11 位 A 开始，通过合并相邻的两个三联体可形成一个 AUG 三联体。由此作为一个可选择的起始密码子而起作用是可能的吗？

由此全部的阅读框将会不同，也就是一个可选择的三联体的序列将从这个位置的右边开始阅读。正如在下边可看到的那样，在 mRNA 的序列中位于上游的潜在的起始位点（如：AUG）决定着阅读的框架。

问题：在表 17.1 所示的氨基酸密码子的含义在所有生物体中是相同的吗？

遗传密码表最初是由对大肠杆菌的研究所证实的，现在，已经知道它在所有生物中均是相同的，即：它是通用的。仅有的例外存在于一些物种线粒体中的少数几个密码子。

17.3　细菌中的 DNA 转录

如遗传密码和关于 DNA 复制分子机制的资料的揭示（第 16 章）那样，现在的关于 DNA 转录产生 RNA 的机制的细节知识主要也是依赖于对细菌，特别是大肠杆菌的研究。主要是由于在细菌中探讨转录现象较为方便。

大部分 DNA 的序列可被转录为 mRNA，而最终被翻译为蛋白质。然而，RNA 数量最多的种类是核糖体 RNA（rRNA）和转移 RNA（tRNA），它们不编码蛋白质而在翻译的过程中起作用。它们由为数较少的基因（称为 rRNA 和 tRNA 基因）大量的转录而形成。在细菌中，所有的基因转录都是由 RNA 聚合酶参与而发生的。

问题：由 RNA 聚合酶催化的化学反应的特点是什么？

整个反应是：

$$n\text{NTP} \xrightarrow{Mg^{2+}} (\text{NMP})_n + n\text{PPi}$$

它使用四个核糖核苷三磷酸（ATP，GTP，UTP 和 CTP）聚合成一个 RNA 链，其序列由 DNA 的模板链所决定。核苷酸的添加是连续的，磷酸二酯键的形成机制与有关 DNA 聚合酶的描述相同（见第 16 章，图 16－9）。RNA 链生成的方向是 5′→3′。RNA 聚合酶和 RNA 聚合酶之间的一个重要的差别是前者在合成新链时并不一定必须要有引物。被组入 RNA 链的第一个核苷酸含有腺嘌呤或鸟嘌呤，并保留其 5′-三磷酸。

问题：在染色体中，一个 DNA 分子含有许多基因，因此当一个特定的基因被转录时，RNA 聚合酶就必须“知道”在哪里开始。这是如何实现的？

为了转录一个特定的序列片段，RNA 聚合酶结合在 DNA 中由模板链或编码链所定义的位于转录起始位点上游（即在 5′端一侧）的一个启动子上。

许多细菌启动子的序列已被测定，且发现：虽然该区域的序列在所有例子中并不相同，然而，有两个位于起始位点第 10 和 35 核苷酸位置附近的片段在所有例子的比较中只有少许不同，因而分别可以界定一个共有序列。图 17－1 显示一些启动子区域，它延至第一个或－10 区域（下划线者）。－10 区域也被称为 Pribnow 框（因发现者而命名）。

另外的保守区域是中心位于起始位点上游第 35 碱基对（bp）的位置（即：－35bp）。该共有序列是 TTGACA；以更详细形式表示该序列是：

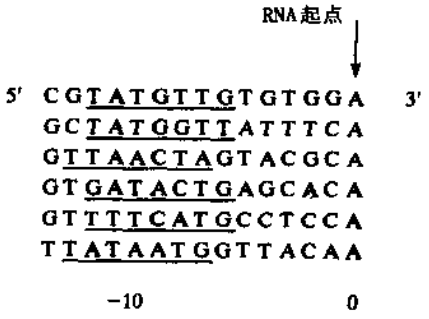


图 17－1　细菌中一些 Pribnow 框序列。下划线为同源性区域

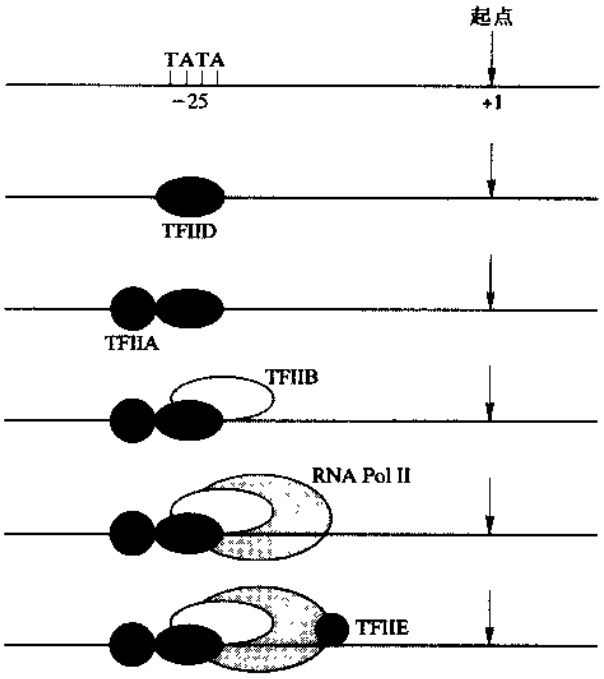


图 17-3　基本的转录复合物的装配

序列，该短序列通过更特化的转录因子被识别。这些位点的结合和位置依启动子不同而不同。大多数 RNA 聚合酶 II 启动子包含六个以上这样的位点，并且它们位于转录起点附近。

这些当中有些相当普遍，并且它们与所有类型细胞中存在的转录因子结合（表 17.2）。这些因子以某种方式改变 RNA 聚合酶 II 转录基因复合物的能力。

表 17.2　某些常见的转录因子

因子	结合	分布
TFIID	TATAA	普遍
CTF/NF-1	CCAATC	普遍
SP1	GGGCGG	普遍
Oct1	ATTTGCAT	普遍
Oct2	ATTTGCAT	普遍
NFKB	GGGACTTTC	淋巴细胞
Erf1	AGATAG	红细胞

增强子的序列分析发现：它们含有许多与启动子存在的和结合转录因子的序列同样的保守下列（TATA 框除外）。

转录因子必须识别和结合在启动子和增强子上的特异靶 DNA 序列上。它们亦一定活化转录。与这些不同功能有关的蛋白质的部分通常存在完全独立的结构域。有许多类型的 DNA 结合的结构域。也许了解得最清楚的是锌指，在锌指中一些保守的氨基酸与锌离子结合。对该活化的结构域了解较少。一般认为，它们与其他的转录因子和（或）RNA 聚合酶的蛋白质/蛋白质相互作用有关。

问题：基因存在于所有细胞的细胞核中，如何产生只限于某一组织的组织特异的蛋白质？

大多数组织特异基因表达的调控发生在转录水平；这是通过组织特异转录因子实现的。例如：那些在红细胞中被表达的所有基因（如：珠蛋白-血影蛋白-促红细胞生成素受体）在它们的启动子中有-AGATA-位点。该位点与转录因子（称为 GATA-1）结合，该转录因子只存在于红细胞中，并且只有在该因子存在的情况下启动子才起作用。

关于启动子序列需求的主要信息来源是突变。启动子中的突变在不改变基因产物的情况下影响其所控制的基因表达的水平。

RNA 称为初级转录物，因为在某些情况下，在其后的使用之前，它需要修饰。

问题：细菌中一个单独的 RNA 转录物能携带一个以上的基因信息吗？

是的。许多相邻的基因可由一个单独的启动子转录形成一个携带这些基因全部信息的 RNA 分子。如果该信息像通常那样是要被表达成蛋白质的，则该单独的 RNA 分子被称为多顺反子 mRNA（一个顺反子是相对于一个基因的遗传单位）。rRNA 和 tRNA 基因组合通常作为一个单独单位被转录。在这些情况中，初级转录物被修饰并最终被核酸酶剪切生成个别的 rRNA 和 tRNA 分子。这是一个初级转录物加工的例子，与原核生物相比，该加工过程在真核生物中更为常见。

17.4　真核生物中的 DNA 转录

真核生物中的转录的基本过程与原核生物中的相似，但是，存在着重要的差异。

问题：与真核生物转录有关的 RNA 聚合酶只有一种类型吗？

不是。真核生物 RNA 聚合酶已从许多组织分离出来，并且在所有情况下，在细胞核中发现了三种不同的酶。它们都含有许多多肽亚单位和复杂的结构。已知 RNA 聚合酶 I 特异地与 rRNA 基因的转录有关。RNA 聚合酶 II 可生成转录物，该转录物最终被加工成 mRNA。RNA 聚合酶 III 负责 tRNA 基因的转录和一种小的核糖体 RNA 基因（生成 5S RNA）转录。这三种聚合酶可根据他们对药物 α-鹅膏蕈碱（鬼笔鹅膏蘑菇毒素）的不同的敏感性来相互区别（该药物对细菌 RNA 聚合酶无影响）。RNA 聚合酶 II 对 α-鹅膏蕈碱非常敏感，而 RNA 聚合酶 I 可完全抵抗该药物的作用。RNA 聚合酶 III 对该抑制物中度敏感。线粒体含有其他类型的 RNA 聚合酶，该类酶不受 α-鹅膏蕈碱的影响，而对抑制细菌 RNA 聚合酶的药物敏感。

真核生物 RNA 聚合酶不同亚单位的作用还不清楚，但推测其中可能有与细菌识别启动子位点的 σ 因子类似的亚单位。如同细菌启动子那样，转录起始位点上游的同源性已被确认。

三种类型的 RNA 聚合酶的每一种识别不同类型的启动子。RNA 聚合酶 I 识别的启动子是由两部分构成的，即：它是由被隔开约 70bp 的两个保守区域构成。RNA 聚合酶 III 的启动子位于转录区域 + 55bp 附近。RNA 聚合酶 II 的启动子非常复杂并且种类繁多。通过 RNA 聚合酶 II 转录的基因是那些产生蛋白质的基因，而且这些蛋白质多数是一个特定的细胞类型所特有的。也许大多数（并不是所有的）高保守区域位于 −25bp。该共有序列表示为 TATA 或 Hogness 框。在此上游（沿编码链向 5′方向）通常有许多较少保守的区域，它决定着基因将在何时，何地及以何样的频度被转录。

真核细胞中，远离转录起点 60kb 的 DNA 的区域可影响基因转录的水平。这些区域被称为增强子。它们可在任意方位上起作用，并且位于基因的 5′端或 3′端。

17.5　转录因子

RNA 聚合酶需要辅助因子（蛋白质）激活转录；它们被称为转录因子。酶与这些因子共同构成基本的转录装置。

对于一个被 RNA 聚合酶 II 转录并在所有类型细胞中表达的基因，一些基本的因子的某些细节已被阐明。这些因子被表示为 TFIIX，此处的 X 意为特定的因子，如：TFIIA，TFIIB，等等（图 17－3）。

RNA 聚合酶 II 的启动子被识别的效率和特异性依赖于位于 TATA 框 5′方向上更远的短

问题：在初级 mRNA 转录物中发生了什么修饰作用？

1. 在其起始后不久，在转录物的 5′端发生了所谓的“带帽”作用。带帽作用的第一个步骤，GTP 总是通过一个三磷酸桥加在鸟嘌呤核苷酸上；这是由鸟苷酸转移酶催化的。在后续的反应中，已加上的鸟嘌呤和初级转录物上头两个核苷酸均被甲基化。5′端的帽在结构上是相当复杂的，它在后续的翻译过程的起始方面具有重要作用。

2. 聚腺苷化在转录物的 3′端添加了一个 40～200 个残基的多聚（A）尾巴。负责该添加作用的酶是多聚（A）聚合酶。多聚（A）尾巴的功能尚不清楚。

如果要形成功能信息，内含子的删除必须是一个非常精确的反应。在基因中内含子-外显子的连接点具有共有序列。有迹象显示：限制在细胞核内的小 RNA（snRNA），其中至少有一些在拼接的连接点含有与共有序列互补的一段序列，由此，跨过两个拼接的连接点形成二级结构使相邻外显子的末端并列，进而为加工酶的剪切和封合提供了一个框架。MRNA 前体的剪接由剪接体实施，该剪接体是由一组核内小核糖核蛋白（snRNP）构成的复合物。（在来自嗜热四膜虫的 rRNA 例子中，只有在 GTP 和某些阳离子存在的情况下，一个单独的内含子被剪接。）

例 17.4

从一个典型的真核生物基因生成一个功能性的 mRNA 的相关步骤如图 17－5 所示。在此图示中，我们假设该基因有六个内含子，以 A～F 表示；外显子以 1～7 表示。对于具体内含子删除的一个限定的顺序图中未显示。

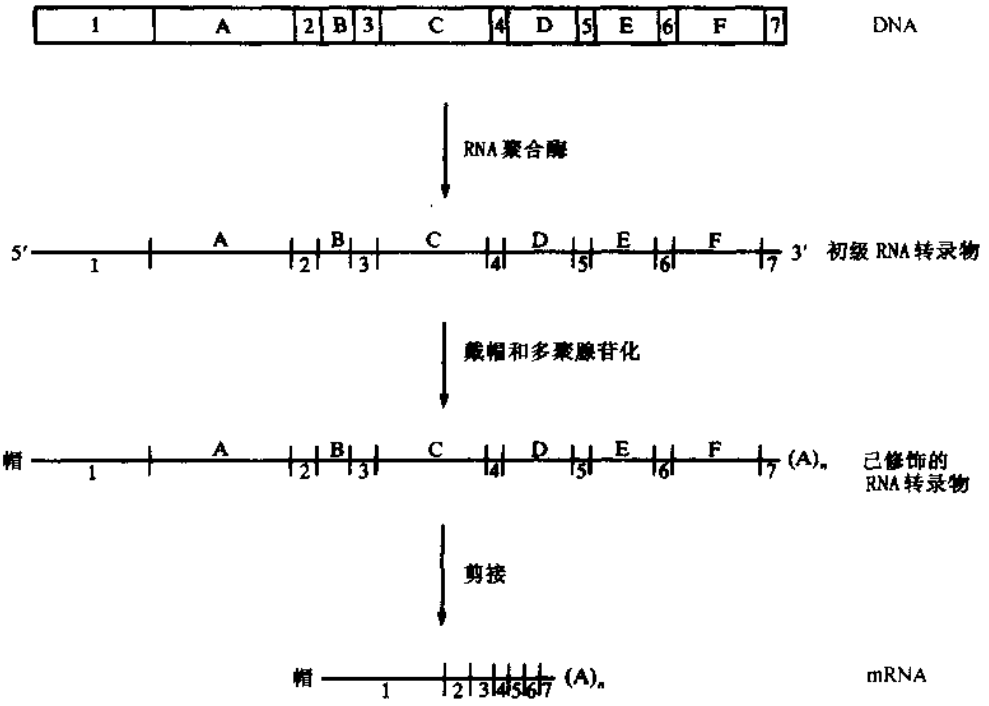


图 17－5　一个真核生物 RNA 转录物的转录和加工成为 mRNA 的步骤

问题：大多数真核生物基因中存在内含子的原因是什么？

内含子确切的功能还不清楚。然而，一些证据显示：外显子或编码序列在最后的蛋白质产物中形成结构域。因此，人们认为：断裂基因，如人们所称，可反映一个进化的过程，在此过程中，多种外显子的结合可通过不同的蛋白结构域的连接产生新的蛋白质。

问题：人类启动子有突变体吗？

是的。有许多人类疾病起因于重要基因启动子区域的点突变。例如：地中海贫血是一种遗传性疾病，其β-珠蛋白基因的启动子的突变引起该蛋白质合成减少并终而导致贫血。该突变常与其启动子对正向转录因子的亲和力减少有关。

问题：增强子如何对距其较远的启动子起作用？

一般认为，增强子依其装配与蛋白质及启动子相互作用的转录因子复合物以其间 DNA 环出的方式而起作用。

问题：组蛋白是如何与 DNA 相互作用（形成核小体）影响转录的？

一般认为，为了转录的进行，核小体的结构必须离解。在从限定的区域进行转录情况下，这种组蛋白的离解或移开必须是特异的。组蛋白通过其碱性氨基酸上的正电荷与 DNA 相互作用。已建立方法用于除去组蛋白，其原理是通过化学修饰减少电荷。例如：精氨酸的乙酰化可除去正电荷，而磷酸化和聚腺苷二磷酸的核糖基化可添加负电荷。在最后的过程中，聚（ADP－核糖）合成酶催化 NAD 的 ADP－核糖部分向组蛋白（也向染色体蛋白质中非组蛋白）的转移。在对诸如激素刺激那样的应答中，这样的修饰其确切的影响作用还不清楚。

问题：真核生物中的转录产生多顺反子 mRNA 吗？

不。而且与细菌中的情况比较，这是个标志。真核生物中，mRNA 是单顺反子，为了进行翻译它必须被转运出细胞核。

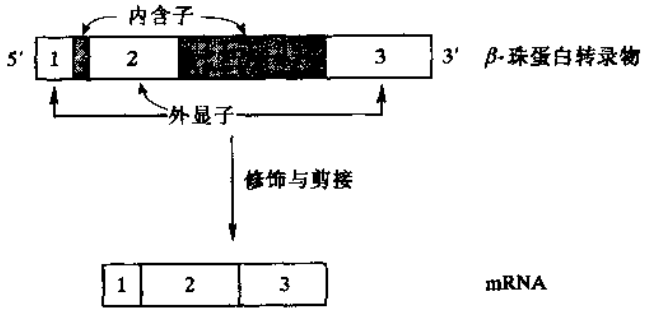


图 17－4　β-珠蛋白基因中内含子与外显子的排布

17.6　RNA 转录物的加工

在细菌和大多数原核生物中，初级转录物提供了可进行翻译的功能性 mRNA。在真核生物中，绝大多数的初级转录物要被化学修饰，并且，在其成熟为功能性 mRNA 之前，其中的某些序列要被移去。这是因为：将被表达为蛋白质的真核生物基因含有不被翻译的插入序列（或称为内含子）。在初级转录物的水平，这些要被切除，或剪接，在 mRNA 中留下与可翻译片段相应的部分。β珠蛋白基因的图示如图 17－4。

首先生成与基因全长相应的初级转录物，然后，进行化学修饰，以及内含子（β－珠蛋白的例子中是两个）通过剪接被除去。初级转录物的混合物存在于细胞核中，一般称其为核内不均－RNA（hnRNA）。

问题：在细菌和真核生物中的转录都能被放线菌素 D 抑制吗？

是的。因为在与模板结合方面，它能识别的结构特点是 DNA 双螺旋，所以，它不能辨别两类生物体。

问题：存在可区分细菌和真核生物转录的抑制剂吗？

是的。例如利福平和利迪链菌素只与细菌 RNA 聚合酶结合并阻断其作用；α-鹅膏蕈碱只与真核生物 RNA 聚合酶 II 结合，并且，也可在很小的程度上与 RNA 聚合酶 III 结合阻断它们的作用。

问题：细菌 RNA 聚合酶是多亚单位的酶。其中，有与利福平和利迪链菌素特异结合的亚单位吗？

是的。二者只与 β 亚单位结合。但是，利福平只阻断 RNA 合成的起始，而利迪链菌素选择性的阻断延伸过程。这说明：β 亚单位与 RNA 链的起始和延伸有关。

17.9　mRNA 翻译的装置

通过翻译装置 mRNA 的核苷酸序列被转换成构成多肽的氨基酸序列。该装置包括tRNA 和核糖体（含有 rRNA 和一组特有的蛋白质）。tRNA 是作为核苷酸序列（定义密码子的顺序）和氨基酸序列之间的接合者来行使装配多肽的功能。

问题：tRNA 分子是如何作为密码子和氨基酸间的接合者在起作用的？

许多生物的许多 tRNA 的核苷酸序列已被确定。它们都含有约 80 个核苷酸，而其中大部分具有特殊的结构（见第 7 章）。对于每一个氨基酸至少有一个 tRNA 与其对应；每个 tRNA 中的序列有所不同，但它们都形成一个共同类型的二级结构（三叶草结构）；在此结构中，RNA 自身折叠给出最大数量的碱基配对。该结构的某一部分与氨基酸的结合有关，而另外的部分含有与该氨基酸的一个（或多个）密码子互补的三个核苷酸的序列。在翻译过程中，这个三核苷酸序列与 mRNA 中的密码子相互作用。还有其他与 tRNA 功能相关的结构特点。

图 17－7 图示了 tRNA 折叠成典型的三叶草结构，它含有几个枝干（碱基配对）和环。不同的 tRNA 有不同的序列，但也有一些区域保持恒定。其中大多数存在环中（在此集中了一些稀有碱基），以及存在于受体干部分的分子 3′端。这个末端的序列总是 CCA，并且，相

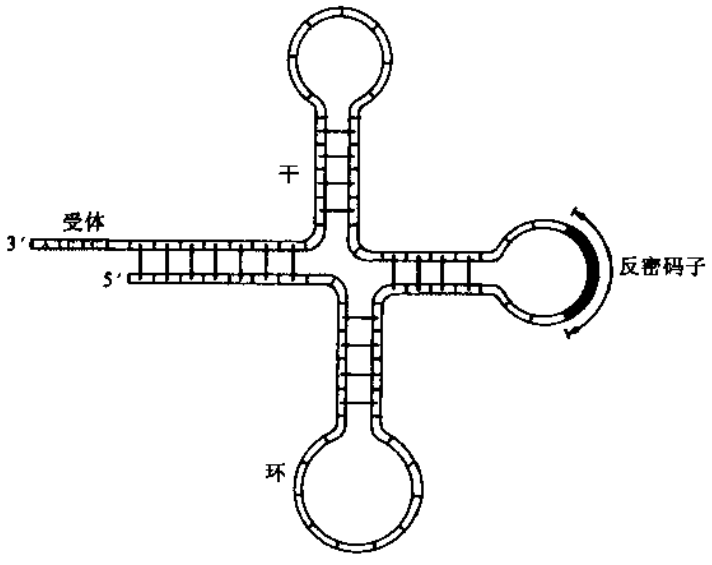


图 17－7　tRNA 折叠的三叶草结构图示

17.7　基因组的组构

基于序列的整体特性，真核生物 DNA 可被分为三种类型：高度重复序列，中度重复序列和非重复序列。

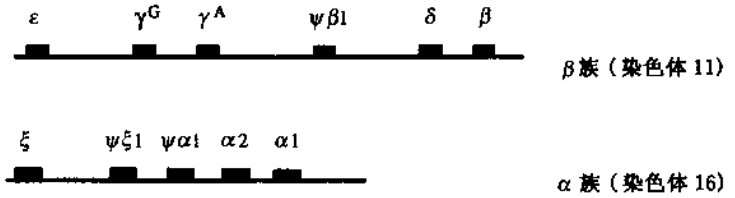
高度重复 DNA 约占基因组的 30%，它由一个频繁重复的简单序列构成，如：…GATC-GATCGATC…。它出现在端粒和着丝粒，并且不被转录。

中度重复 DNA 约占基因组的 30%。在此，基因组中该 DNA 序列本身就比较复杂，并且，其重复的频度较小，大概是 100 次。核蛋白体基因和组蛋白基因属于此类。

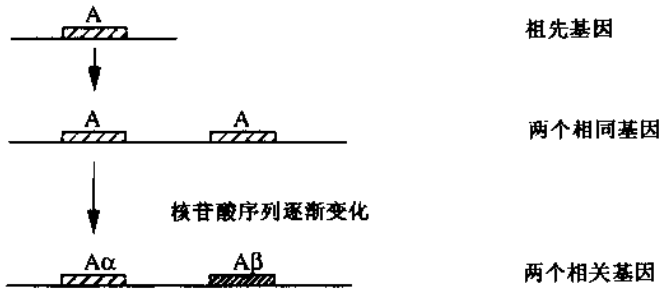
非重复 DNA 约占基因组的 40%。其大部分的功能是未知的，而且，只有约 5%是由编码蛋白质的基因构成的。

问题：如果我们假定基因的长度平均为 10 000bp，那么哺乳动物基因组（3×10^9bp）中的基因数量将是 300 000。但是，所有的证据显示：只存在10 000~30 000 个基因。其余所有的 DNA 有什么作用？

我们的确不清楚。一般认为：这些额外的 DNA 也许是基因家族进化的产物。许多结构相似并成簇存在的基因可能源自突变后的成倍复制。由此引起一组在序列上有少许差异的基因并列存在。基因家族的某些成员也许已发生突变，且不再具有功能。它们被成为拟基因（图 17-6）。



(a) 人类珠蛋白基因族



(b) 多基因家族进化的可能模式

图 17-6　以珠蛋白基因例示基因簇的进化

例 17.5

在大肠杆菌中，在任一时间点，mRNA 只占细胞总 RNA 的 3%～4%。基因组 DNA 中仅有 0.2%用于编码 20 + tRNA，并且有 0.5%编码 rRNA。因此，99%以上的基因组作为 mRNA 合成的模板。

17.8　转录的抑制剂

许多抗生素通过抑制转录而起作用。放线菌素 D（见第 16 章）是一个通过与 DNA 模板结合实施影响的例子；它也能阻断 DNA 的复制。

表 17.3　真核与细菌核糖体的组成

细胞	真核生物
70S 核糖体	80S 核糖体
30S 亚单位	40S 亚单位
=16S RNA + 21 蛋白质	=18S RNA + ~30 蛋白质
50S 亚单位	60S 亚单位
=23S RNA + 5S RNA + 34 蛋白质	=28S RNA + 5．8S RNA + 5S RNA + ~50 蛋白质

在细菌核糖体的小亚单位和大亚单位的精确结构（界定许多蛋白质的表面位置）方面和亚单位相互作用的方式方面，有大量的有用信息。其中的一些图示与图 17－9 中；该图的进一步的解释可参见后续的课文。

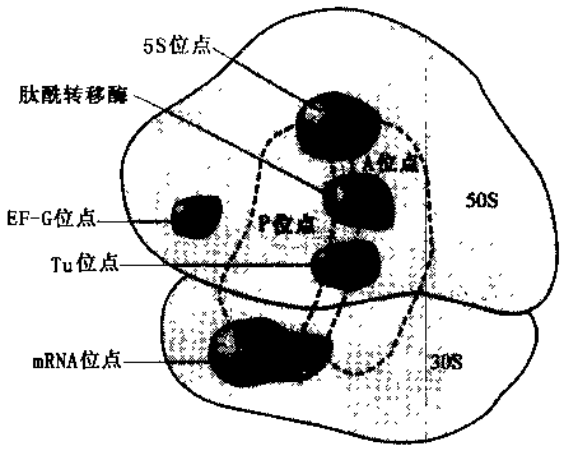


图 17－9　大肠杆菌核糖体上的一些位点图示。与 fMet－tRNA 相应的肽酰（P）位点参与多肽链的起始。与氨基酰－tRNA 相应的 A 位点。蛋白质 Tu（T 为转移，u 表示遇热不稳定）释放氨基酰－tRNA 至 A 位点。EF－G 代表延长因子 G

17.10　细菌中的 RNA 翻译

因为对于细菌中核糖体与 mRNA 的相互作用以及多肽的装配，我们较为清楚，所以首先要详细地了解这些。真核生物中的这些过程与此相似，并且真核生物独有的特征将在下一节讨论。

RNA 信息翻译成多肽的过程有三个阶段：起始，延伸和终止。亦如前述，细菌中的起始阶段涉及 30S 核糖体亚单位与 mRNA 相应的位置的相互作用。

问题：mRNA 有什么结构特征使其能与 30S 亚单位相互作用？

在 mRNA 的 5′端，在起始密码子 AUG 之前有一个 20 个左右核苷酸的区域。该前导区域有一段序列参与 mRNA 与 30S 的相互租用。它被称为 Shine-Dalgarno（S-D）序列，它可与 16S rRNA 的 3′端的互补序列结合，并为起始过程确定 30S 亚单位的合适位置。在前导区域的其他序列可能与翻译的整个起始过程有关，它也与相应负荷的蛋氨酰－tRNA 和相应的 AUG 密码子的结合有关。

问题：除了存在与 AUG 相对应的反密码子以外，蛋氨酰－tRNA 有特殊的性质可满足翻译的起始阶段的需求吗？

应的氨基酸通过其羧基结合在 3′OH 上。与氨基酸密码子互补的三核苷酸组成反密码子（图 17－7 的阴影部分）。tRNA 的三维结构已清楚。在此结构中，有一些额外的 H 键在更长的 L 形结构中稳定着三叶草结构，使受体序列在一端而反密码子环在另一端。对于每一个氨基酸至少有一个 tRNA，而没有任何一个氨基酸可以识别所有密码子。

问题：一个具体的 tRNA 分子如何能适应一个以上类型的密码子？

这可用摆动学说来解释，该学说认为：当 mRNA 上的一个密码子与反密码子相互作用时，在密码子第一位（三联体的 3′端）碱基和反密码子第一位的碱基之间可发生自由的配对。稀有的次黄嘌呤核苷经常出现在末尾的位置，它可与 A、U 或 C 配对。在该位置上一个以上类型的配对的可能性源自这样的事实：当对于一个具体的氨基酸有一个以上的密码子的时候（称为同义密码子，见表 17.1），其差别通常只在第三位置。

一个氨基酸结合到其相应的 tRNA 上是通过氨基酰－tRNA 合成酶催化和 ATP 的水解而实现的。对于每一个氨基酸都有一个特异的酶，它可识别该氨基酸所有的 tRNA。反应分两步进行并且需要 Mg^{2+}（图 17－8）。第一步，氨基酸活化，产生氨基酰－AMP－酶中间体。在第二步中，氨基酰基团被转移到其相应（同源的）tRNA 上，氨基酸通过一个酯键与 tRNA 相连。这说明：在合成酶与 tRNA 之间的识别是通过这两个分子间非常精确的接触而实现的，即：通过一个点的接触就可从其他 tRNA 中辨认出其相应（同源的）tRNA。第一个反应通

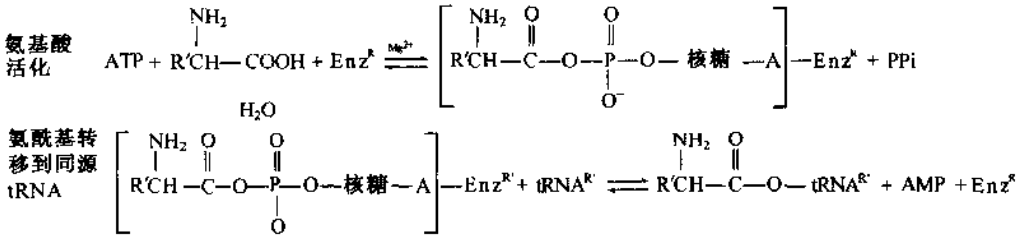


图 17－8　氨基酸与其同源 tRNA 结合的反应。R′表示氨基酸，Enz 表示相应的合成酶，tRNA 表示同源 tRNA

过水解 PPi 而向右进行，因此，在一个氨基酸整个的活化和结合过程中，有两个高能磷酸键被消耗。

mRNA 和氨基酰化的 tRNA（“负荷”的 tRNA）在核糖体上相互作用。最初的相互作用以这样的方式进行：使第一个氨基酸（蛋氨酸）的密码子与其相应的“负荷”tRNA 相互作用并开始多肽的合成。

例 17.6

核糖体由小亚单位和大亚单位构成，通过它们在离心管中不同的沉降速率可以彼此区分（第 4 章）。小亚单位在多肽合成的起始阶段具有重要的作用。在细菌中，小亚单位和大亚单位各自的沉降系数分别是 30S 和 50S。它们相互作用形成 70S 的核糖体。在多肽合成的过程中，该相互作用发生在整个过程中的最初阶段。在真核生物中，亚单位的构成与细菌中相似，只是有一个亚单位较大。小亚单位（40S）和大亚单位（60S）形成一个 80S 的核糖体。核糖体两种类型的亚单位具有相同的功能，这是由 RNA 的类型和存在它们中的蛋白质类型所决定的。这些在表 17.3 中列出。

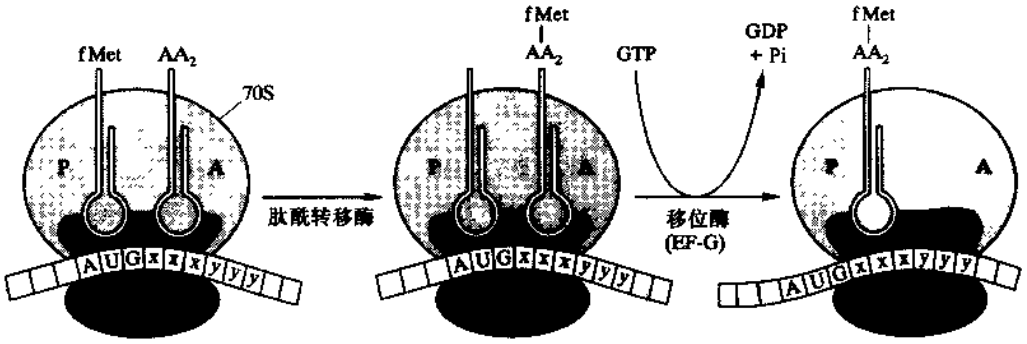


图 17-11　多肽合成的延伸阶段

问题：长的多肽链是如何从其酯键释放并转至 P 位点上的 tRNA 的？

在细菌中，有三个释放因子：RF1，RF2 和 RF3。为了对终止密码子作出反应，它们可能与 A 位点结合（一多种方式），然后引起酯键水解释放出多肽链；由此，它们在多肽链形成了自由的羧基末端。

问题：在翻译过程中，核糖体沿 mRNA 移动，空出前导区域（含有核糖体结合位点）。在前一个肽链完成之前，可开始另一个新肽链的起始阶段吗？

是的。对于任何一个 mRNA 都可被许多核糖体同时进行翻译。它们形成了一种结构，称为多聚核糖体。

17.11　真核生物中 RNA 的翻译

真核生物中翻译的分子机制与原核生物的非常相似。氨基酸的活化以及与 tRNA 结合，多肽链的起始、延伸和终止的各个阶段基本上与原核生物相同。真核生物和细菌的核糖体大小亚单位在链的起始和延伸方面的作用是相同的。

在细菌和真核生物的翻译机制方面有两点与翻译起始有关的显著差别。第一点，真核生物中有两种蛋氨酸的 tRNA，其中之一用于起始阶段，而两者的负荷形式均不被甲酰化；真核生物中不存在转甲酰酶。更为显著的第二点不同是：在翻译的起始阶段涉及到 mRNA 5′端甲基化的帽子。如果该帽子缺失，翻译不能进行。现已明确，40S 核糖体亚单位与 mRNA 的前导区域结合需要额外的称为帽结合蛋白质的因子。有证据提示：帽子是 40S 亚单位结合所必需的主要特征结构。

17.12　蛋白质的翻译后修饰

在核糖体上合成的大多数多肽，其后均被化学修饰。细菌中多肽 N 末端蛋氨酸的甲酰基被脱甲酰酶除去。在细菌和真核生物中，N 末端的蛋氨酸（有时与少数稀有氨基酸一起）均可被氨肽酶除去。

问题：在表 17.1 的遗传密码表中没有羟化脯氨酸和羟化赖氨酸。这些氨基酸是如何出现在某些蛋白质中的？

羟化脯氨酸和羟化赖氨酸主要存在于胶原蛋白中。这些羟化形式是在胶原蛋白链合成后由特定的酶对脯氨酸和赖氨酸残基进行修饰而形成的。另人感兴趣的是：羟化脯氨酸的脯氨酰羟化酶需要抗坏血酸

是的。蛋氨酸有两个 tRNA，这两类 tRNA 可依据当它们负荷蛋氨酸时被转甲酰酶甲酰化的能力加以区别。这两类被称为：tRNA 和 tRNA 。前者可被甲酰化生成 N－甲酰基 Met-tRNA（或缩写为 fMet-tRNA）并且特异地与多肽链的起始有关。可以推测，此种情况中，RNA 结构的独特性质是起始过程所必需。

mRNA，fMet-tRNA 和核糖体亚单位，三个起始因子和 GTP 均与多肽合成的起始阶段有关。例 17.7 介绍了这个过程。

例 17.7

RNA 翻译的第一步开始于多肽合成的起始阶段（图 17－10）。GTP 与 30S 起始复合物结合，随后被水解和释放，并与 50S 亚单位结合。fMet－tRNA 占据核糖体的肽酰（P）位点（图 17－9）；另一位点（A）（可容纳氨基酰－tRNA）在此阶段是空的。它与 mRNA 上的下一个密码子（图 17－10 中以 xxx 表示）对齐。

问题：以相应的氨基酰－tRNA 填充 A 位点有特殊的机制吗？

是的。相应的负荷 tRNA 向 A 位点转移需要一个蛋白质－GTP 复合物的协助。该蛋白质称为 Tu（之所以如此命名是由于它是一个转移因子，并且遇热不稳定），它是一个延伸因子。在向 A 位点释放氨基酰－tRNA 的同时 Tu-GTP 被水解成 Tu-GDP + Pi。而后，Tu-GTP 可通过涉及另外的蛋白质 Ts（一个热稳定转移因子）的反应，以及 Tu-GDP 和 GTP 而生成。如此在氨基酰－tRNA 与 A 位点结合的过程中有两个高能磷酸键被消耗。对于肽键的形成（延伸）现在已一切就绪。

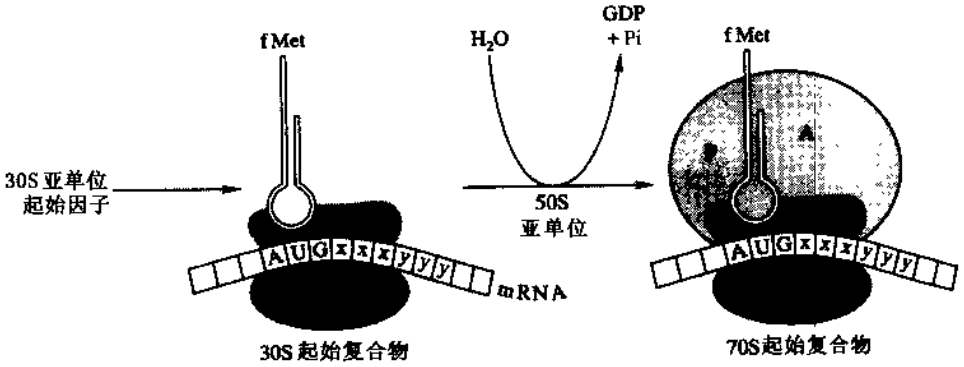


图 17－10　肽链合成的起始阶段

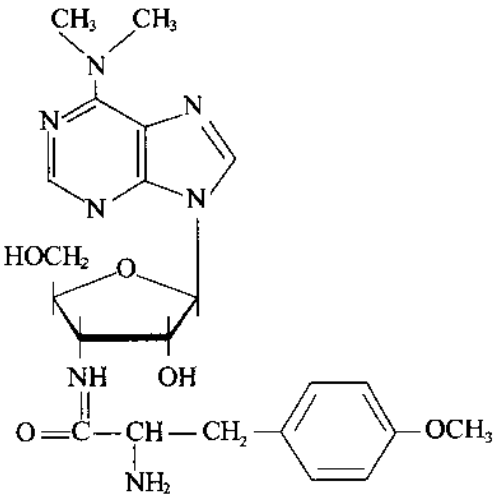
多肽合成的延伸阶段和其终止阶段在例 17.8 中介绍。A 位点被 AA_2-tRNA 填充，此处的密码子是 xxx。

例 17.8

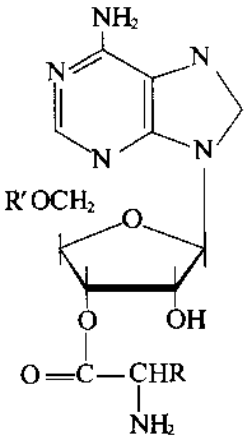
RNA 翻译的第二步骤涉及肽链的延伸（图 17－11）50S 亚单位蛋白成分之一为肽酰转移酶。如其名所示，它把 fMet（及后续的反应中的肽类）从 P 位点向 A 位点转移。为此，fMet 与其 tRNA 连接的酯键发生断裂，氨基酰基被转运至相邻氨基酰－tRNA（图 17－11 中的 AA_2-tRNA）的氨基上形成第一个肽键。在下一步，一个称为延伸因子 G（EF-G，与 GTP 的水解有关）的移位酶移动（或移位）核糖体一个密码子距离到 P 位点上的二肽酰－tRNA的位置，留下可用于结合另一个氨基酰－tRNA 的 A 位点。该氨基酰－tRNA 结合的过程，肽键形成和移位，持续到终止密码子的出现。终止密码子（排在空的 A 位置）的出现说明肽链合成完成。

问题：哪个抑制剂可阻断细菌和真核生物中的翻译过程？

这方面例子是：梭链孢酸和嘌呤霉素。前者抑制负荷 tRNA 与核糖体 A 位点的结合。嘌呤霉素的作用基于其与氨酰－tRNA 结构的相似性（见下）。



嘌呤霉素

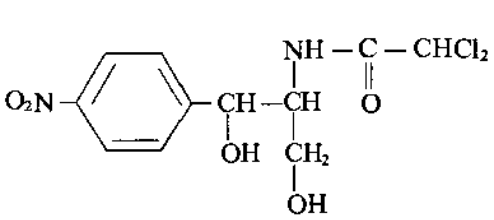


氨酰－tRAN

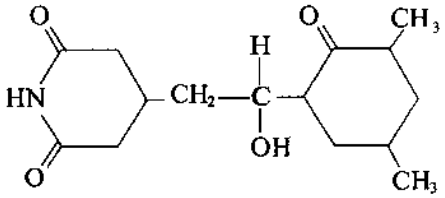
嘌呤霉素作为肽基转移反应中的接受者，与氨酰－tRNA 竞争；增长的肽链转移到嘌呤霉素的 NH_2 基团上致使肽链过早地终止。

问题：存在作用在细菌和真核生物中功能相似靶点的不同的抑制剂吗？

是的。氯霉素抑制细菌 50S 核糖体亚单位的肽基转移酶，而放线菌酮抑制真核生物核糖体 60S 亚单位的功能相似的酶。它们的结构如下所示。



氯霉素



放线菌酮

有趣的是氯霉素可阻断线粒体中的翻译过程，这进一步表明：细菌与线粒体基因表达的机制具有相似性。

有许多细菌和真核细胞特异的抑制剂。白喉毒素就是其中之一，它只影响真核生物。

例 17.10

白喉杆菌产生的白喉毒素是一条含有两个链内二硫键的多肽（M_r=63 000）。分子的一部分，A 片段（M_r=21 000），它必需进入到细胞质中才行使它的毒性作用。通过一个巧妙的复合机制，在细胞膜上较大的分子被裂解为二产生 A 和 B 片段。后者帮助 A 片段进入细胞质，在此 A 片段特异地催化移位酶（EF2）的化学修饰（ADP－核糖基化作用）并抑制该酶的活性使多肽链的生长被阻断。

(维生素 C) 作为辅反应物。经常出现的其他类型的化学修饰是：天冬酰胺、丝氨酸和苏氨酸残基与糖结合（糖基化作用），以及丝氨酸磷酸化。化学修饰也与细胞内合成的蛋白质向细胞外转运有关。

问题：蛋白质是如何通过疏水的细胞膜向细胞外转运的？

细胞（细菌和真核生物）的分泌型蛋白质通常以前体的形式被合成。该形式在 N 端含有一段由15～30 个疏水的氨基酸残基构成的信号序列。如同其在核糖体上形成的那样，该序列以某种方式附着在膜上，继而，穿过细胞膜。在多肽链延伸的同时，它通过膜并来到膜的另一边。同时信号序列被信号肽酶除去。在细菌中，这样的过程可把蛋白质转运至周质间隙（在细胞膜的内膜和外膜之间）或全部转运出细胞。在真核生物中，信号肽可把蛋白质转移到内质网腔中，在此，以其他的机制转运出细胞。胰岛素是一个很好的分泌蛋白质转运出真核细胞的例子。

例 17.9

胰岛素是在胰腺的特殊细胞（胰到岛中的 β 细胞）中形成的。mRNA 的直接产物是一条称为前胰岛素原的多肽。与前胰岛素原向胰岛素转变的修饰过程示于图 17－12。

猪的前胰岛素原是一条 107 氨基酸残基的多肽。信号肽在核糖体上合成后，它识别内质网上的受体并与其结合（核糖体通过肽链与内质网结合构成粗面内质网，第 1 章）。该多肽链通过膜后进入内质网腔，在此，23 个残基的信号肽被除去并产生一条 84 个残基的短链；后者自身折叠连接半胱氨酸残基形成分子内二硫键。该折叠的分子称为胰岛素原。

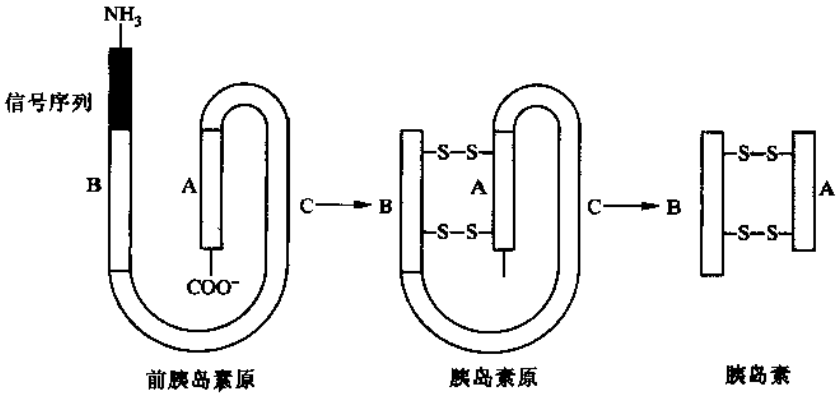


图 17－12　前胰岛素原向胰岛素的转化

胰岛素原由膜囊包裹被转运到高尔基体，在此，开始向胰岛素的转化。这包括裂解未交联的链（C），如此移去“连接”肽。通过分泌颗粒该分子从高尔基体向细胞质膜转运，该颗粒与膜融合并释放成熟的胰岛素（由两条二硫键联结的多肽链构成）到血液，至此转化过程结束。

17.13　翻译的抑制剂

因为 mRNA 翻译成蛋白质涉及许多步骤，所以，抑制剂有大量可利用的机会去阻断这个过程。细菌中许多抑制剂的作用就基于对翻译过程的阻断。

对于基因表达的调控，真核生物要比细菌具有更多的潜在机会。例如：细胞在初级转录物加工水平的调控方面具有便利条件。众所周知，只有所有的内含子被切除，RNA才能被转运跨过核膜。一个更精细的调控可能涉及剪切特定转录物选择程序。现已知有一些例子以此种方式产生不同的mRNA分子。或许，在真核生物中了解最清楚的另一个水平调控例子是珠蛋白合成的翻译水平的调控。

☞例 17.12

珠蛋白在网织红细胞中合成（见第1章，问题1.1），而网织红细胞没有细胞核，所以它不能利用调控转录程序和其他潜在的程序。从富含珠蛋白mRNA池合成珠蛋白的调控与高铁原卟啉［Fe（III）－原卟啉］的浓度密切相关；高铁原卟啉对蛋白质合成的一个转录抑制剂有抑制作用。该抑制剂是一个蛋白激酶，它通过磷酸化的方式抑制一个与翻译起始有关的起始因子。当高铁原卟啉的浓度生高，高铁原卟啉与该激酶的调节亚单位，致使珠蛋白合成能够进行。

然而，真核生物基因表达调控的最重要的形式是在转录水平发生的。人类基因组比大肠杆菌基因组要大1000倍，但基因的数量只大50倍。蛋白质，平均比较来看并不大。那么所有额外的DNA有何作用？可能真核生物基因组的绝大部分与基因调节有关，如：决定是否转录。增强子单元（很清楚，它在此过程中起作用；见17.4节）常位于距许多基因的编码序列较远的位置，在某些情况下可远至20kb。一些单元称为基因座控制区（LCR），其中多数是作为增强子在起作用，LCR单元在染色质较大区域保持“开放”结构。“开放”染色质与常染色质相对应被列为异染色质。异染色质常由重复序列DNA构成并且没有转录活性（见第7章）。这些LCR似乎有组织特异性，即：它们只在某一类型的细胞中起作用，在这些细胞中与其临近的基因是活跃的。在特殊类型细胞中在染色质的特定区域保持“开放”构象也许是真核生物中基因表达调节的主要手段。

问题解答

遗传密码

17.1　假设前三个核苷酸定义第一个密码子，这个被（a）UAAUAGUGAUAA，和（b）UUAUUGCUUCUCCUACUG编码的肽的序列是什么？

答：

(a) 没有。这四个密码子不被翻译，它们是链终止的信号。

(b) $(Leu)_6$。这个例子显示亮氨酸遗传密码的简并度；有六个亮氨酸的密码子，在所有氨基酸中这是最多的。

17.2　在序列AAUUAUGUUUCCAUGUCCACCU辨认两个可能的翻译起始的位点，并写出前三个氨基酸的序列。

答：

AUG是最常见的起始密码。由该序列中遇到的第一个AUG开始的九个核苷酸的序列为：AUGUUUCCA。它是Met-Phe-Pro的编码。由此再往下的序列是：AUGUCCACC，这是Met-Ser-Thr的编码。

17.3　在一个基因的DNA编码链中，密码子序列ATA被突变为ATG。伴随DNA的复制，在多肽产物中会引起什么变化？

答：

除了DNA中的T被换成U以外，DNA编码链在mRNA中给出与此相应的序列。因此，密码子将由AUA变成AUG。这使异亮氨酸被蛋氨酸所取代。

17.4　一个mRNA含有如下翻译序列，已限定三个一组的可读框：

AUG，CUC，ACU，UCA，GGG，AGA，AGC

17.14　基因表达的调控

基因表达的终产物是蛋白质，主要是酶类，其表达的水平被严格地控制是致关重要的。在细菌和真核生物中有许多潜在的调控位点。真核生物中的 DNA 或基因扩增（第 16 章）是应答产生更多蛋白质指令的一个方式；如果该基因有许多拷贝，那么转录能以更快的速率进行。调控更经常地发生在转录水平或翻译水平，对于细菌和真核生物，前者可能更为重要。转录水平的调控在细菌中特别有效，这是因为在这样的细胞中 mRNA 的半衰期非常短（几分钟）；而真核生物中 mRNA 的半衰期较长。转录调控的模型是大肠杆菌的乳糖操纵子。

例 17.11

乳糖操纵子是大肠杆菌染色体的一个～5.3kb 的区域，它含有编码负责乳糖代谢的酶类的基因。β－半乳糖苷酶，半乳糖苷通透酶，硫代半乳糖苷转乙酰酶，这三个酶的基因相互相连排列在 DNA 的这个片段中。它们被转录为一个 RNA 单位；该转录被 DNA 的 5′方向上 5.3kb 片段的序列（调控单元）所调控。该调控单元由一个启动子（RNA 聚合酶结合位置）和一个相邻的操纵基因（阻抑蛋白可与此结合并阻断由 RNA 聚合酶催化的转录过程）构成。阻抑物是由位于启动子 5′侧的一个基因生成的。这被图示于图 17－13 中。因为全部三个基因，z，y 和 a，作为一个单元被转录（多顺反子 mRNA），所以，它们被称为协同表达。当转录被阻抑物阻断，所有基因均不表达。

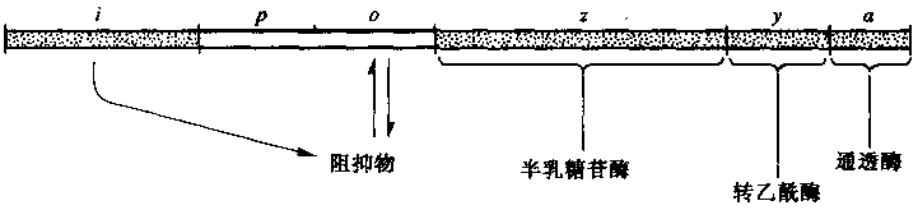


图 17－13　大肠杆菌乳糖操纵子。缩写：i＝阻抑基因；p＝启动子；o＝操纵基因；z＝β－半乳糖苷酶；y＝通透酶基因；a＝转乙酰酶基因。i 基因产物是阻抑物

问题：细胞是如何克服抑制进行乳糖操纵子基因的？

当乳糖加到培养的细胞中，有少量的乳糖进入细胞并且被转变为异乳糖。该代谢物与阻抑物结合，改变阻抑物构象使其从操纵基因上释放。然后，RNA 聚合酶便可转录这三个基因。可以说，异乳糖是作为一个诱导物在起作用。这种由诱导物解除抑制的现象是表达负调控的一个例子。

在乳糖操纵子中也存在正调控的现象。分解代谢物激活蛋白（CAP）（带有 cAMP）在 RNA 聚合酶与其启动子结合过程中是必需的，即：在转录上它有直接的正向影响。然而，在葡萄糖存在的情况下，抑制的解除（即诱导作用）将不发生，这是由于葡萄糖可降低 cAMP 的水平，导致 CAP 不能行使其影响。这反映了细胞优先使用葡萄糖而不是乳糖作为其碳源的原因。由此可以看出，细胞严格地调控着乳糖基因的表达；只有在存在需要代谢的乳糖时，它们才被表达。

问题：在真核生物中有转录调控的好的例子吗？

已证实许多类固醇激素（第 13 章）是通过刺激转录过程而发挥作用的。通过一系列复杂的步骤，涉及与细胞质受体的相互作用，激素进入细胞核，在此，或是依靠自身或是靠其受体或其他蛋白质的协助，它结合在 DNA 上一个特定的位点。它是如何确切地诱导转录的还不清楚，但是，似乎正调控机制和负调控机制均被涉及到。一个研究得较为清楚的例子是：鸡输卵管中雌激素中介的卵清蛋白 mRNA 合成的诱导作用。

一个 pppA 或一个 pppG。

17.10　Pribnow 框与细菌启动子等同吗?

答:

不。Pribnow 框只是启动子序列的一部分。它与 -7 核苷酸的 - 10bp 区域相符合。另外的以 - 35bp 位点为中心的区域是启动子的重要部分。

17.11　对于转录的起始,细菌 RNA 聚合酶的哪个亚单位是启动子需要的?

答:

首先,σ亚单位对于与启动子结合及开放启动子复合物的形成是需要的。其次,β亚单位(它可与抑制剂利福霉素结合)对于第一个磷酸二酯键的形成是必需的。

17.12　转录终止序列被编入 RNA 转录物中吗?

答:

是的。RNA 聚合酶转录这翻转重复序列后,该区域有能力在单链转录物中形成发卡结构,至少在某种程度上,该发卡结构与链的终止有关。

17.13　有多少转录终止序列存在于多顺反子 mRNA 中?

答:

作为细菌中形成的初级转录产物,多顺反子 mRNA 是一个从一个启动子转录的一个连续长段的 RNA。因此,它将只保留一个常规的终止序列(即忽略在起始密码子前的可能存在的弱化子序列)。

17.14　在细菌中存在 RNA 转录物的加工过程吗?

答:

加工是指对 RNA 聚合酶合成的初级转录物的修饰。在细菌中,加工过程只限于含有 rRNA 和 tRNA 的转录物。在此种情况中,大的转录物被化学修饰,然后,被核酸酶降解成小的 rRNA 和 tRNA 的成熟形式。

真核生物中 DNA 的转录

17.15　你认为在真核生物中有多少类型的 RNA 聚合酶?

答:

四种。在细胞核中,有 RNA 聚合酶 I、II 和 III。在线粒体中,有另外的 RNA 聚合酶,它与细菌的 RNA 聚合酶相似。

17.16　在 RNA 链增长的一般机制方面,真核细胞中各种类型的 RNA 聚合酶有何差别?

答:

没有。所有 RNA 聚合酶都使用双链 DNA 作为模板并且只拷贝一条链;它们合成 RNA 的方向是 5′→3′,并使用核糖核苷三磷酸作为底物。

17.17　α-鹅膏蕈碱能影响一个真核细胞主要的转录活性吗?

答:

不能。细胞中数量最多的 RNA 成分是 rRNA(第 7 章)。rRNA 基因是由 RNA 聚合酶 I 转录的,RNA 聚合酶 I 可抵抗 α-鹅膏蕈碱。

17.18　α-鹅膏蕈碱可通过影响底物的利用率来实施其对某种真核 RNA 聚合酶的抑制作用吗?

答:

不能。所有的 RNA 聚合酶使用相同的底物,α-鹅膏蕈碱可抑制一些 RNA 聚合酶,但并不是全部。

17.19　一般来讲,真核生物单顺反子 mRNA 能说明其为一个初级 RNA 转录物吗?

答:

不能。在绝大多数情况中,真核生物中的 mRNA 总是单顺反子,它是通过对初级转

(a) 从该序列产生什么氨基酸？(b) 如果遇到的第一个 C（含有胞嘧啶的核苷酸）从该序列中删除，产生的新氨基酸序列是什么？

答：

(a) 原来序列可给出的氨基酸序列：Met-Leu-Thr-Ser-Gly-Arg-Ser。

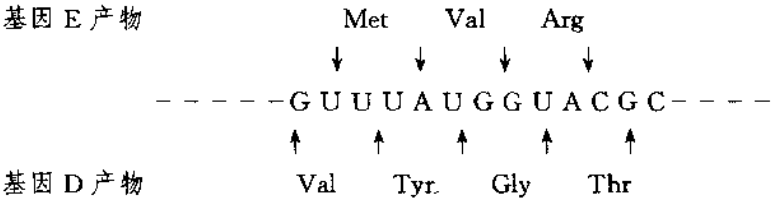
(b) 新序列为：AUG，UCA，CUU，CAG，GGA，GAA，GC；

它给出的氨基酸序列为：Met-Ser-Leu-Gln-Gly-Glu。

17.5 在病毒 ΦX174 的 DNA 中，与其基因编码的产物（九个不同的蛋白质）相应的核苷酸残基显得数量不足。这是如何发生的？

答：

在此情况中，通过使用一个以上的可读框，相同的核苷酸序列可编码一个以上的蛋白质。就是说：编码一个蛋白质的密码子序列可与另一个基因序列的相位有重叠。见下图。



17.6 DNA 复制的正确性依靠“校对”功能来保证，在互补序列中任何位置出现的错误将被删除和修复（第 16 章）。为什么在蛋白质合成的过程中没有相似的机制？

答：

蛋白质合成过程中错误的影响并不严重。一般来讲，一个有缺点的蛋白质分子将不引起有害的影响；这样的蛋白质也许没有完整的功能或不稳定，且对于细胞来讲也许是能量的消耗；然而，这样的错误在未来的子代中不会成为永久性的。

17.7 一个 DNA 双螺旋片段的模板链含有这样的序列：5′-GCTACGGTAGCGCAA-3′。

(a) 从该链转录的 mRNA 的序列是什吗？

(b) 假设整个转录物被翻译，它编码的氨基酸序列是什吗？

答：

(a) 被转录的 mRNA 将与上述链互补，且以 U 代替 T：

3′-CGAUGCCAUCGCGUU5′

写成 5′→3′方向：

5′-UUGCGCUACCGUAGC-3′

(b) 从 5′→3′方向翻译，产生如下序列：-Leu-Arg-Tyr-Arg-Ser-。

细菌中 DNA 的转录

17.8 一条具体的 DNA 链能同时作为编码链和与转录相关的模板链吗？

答：

是的。为此，RNA 聚合酶催化的转录是在双链 DNA 片段上以相反的方向从不同的启动子开始进行的。双链 DNA 的每一条链均可作为编码链和模板链，但是，产生的是不同的 RNA 转录物。

17.9 下列的哪一个不可能表示一个 RNA 转录物的 5′端？

(a) pppApGpCpU……

(b) pppUpCpGpA……

(c) pppCpApGpA……

答：

只有 (a) 是适合的，因为在转录的起始过程中，RNA 聚合酶总是在第一个位置编入

17.27　为什么 tRNA 不能依相应的 AUG 密码子在多肽合成的起始阶段起作用?

答:

在翻译的起始阶段，特异地使用蛋氨酰-tRNA 系列的 tRNA 。与小核糖体亚单位，mRNA 的前导区域，起始因子和 GTP 构成的第一个起始复合物相互的起始作用可能需要该系列特有的核苷酸序列。如同真核生物中不存在这种情况一样，对于起始阶段，甲酰化（这只能与 tRNA 生成）可能未必是必需的。因此，由于在 RNA 中并没有对特殊结构的要求，tRNA 与起始无关。

17.28　一个氨基酸组入多肽的过程中消耗了多少 ATP 的等价物?

答:

一个 ATP 用于 tRNA 的负荷，另外，在氨酰-tRNA 与核糖体的 A 位点结合和移位的每一步骤消耗一个 GTP。因此，忽略起始阶段，每一个氨基酸的组入使用三个 ATP 等价物。但是要注意，在氨基酸活化的过程中，产物是 ANP 和 PPi，后者水解为 Pi 致使反应完成。因此，对于每一个氨基酸的组入要使用四个高能磷酸键的等价物。

17.29　在移位的过程中，肽酰-tRNA 从核糖体上的 A 位点转移到 P 位点。在肽酰-tRNA 反密码子-密码子相互作用的过程中发生了什么?

答:

这必须保持顺畅，能说得清楚一些的是：整个核糖体移动了与肽酰-tRNA-mRNA 复合物相关的一个密码子位置。

17.30　什么主要结构对于真核 mRNA 翻译的起始阶段是必需的而该结构不存在于细菌 mRNA上?

答:

在真核生物为形成 mRNA 的初级转录物加工过程中，一个甲基化鸟嘌呤的“帽子”结合在 5′端。这对于成熟真核 mRNA 翻译有效的起始是必需的，然而，这个过程在原核生物中是不存在的。

17.31　有什么明显的原因使真核生物不形成多聚核糖体?

答:

多聚核糖体是在 mRNA 5′端负荷一系列核糖体形成的；在任一时间点，有许多核糖体沿着一条 mRNA 在行进。显然，多聚核糖体可在真核生物中形成。一旦第一个核糖体从该核糖体结合位点移动了一段明显的距离，就没有理由使后续的核糖体不以竞赛的正常顺序载于其上。

17.32　原核生物中的转录-翻译偶联表示在其从 DNA 模板转录完成之前一个 RNA 分子的翻译就已经开始了。这种情况能发生在真核生物中吗?

答:

不能。真核生物的转录必须在细胞核中完成。最终产生的 mRNA 被转运到细胞质中后才能被翻译成多肽。

蛋白质的翻译后修饰

17.33　当蛋白质在高温下被酸水解，它被降解成其组成单位氨基酸。通常，其中会有胱氨酸。但是，密码子表中没有胱氨酸。这是为什吗?

答:

胱氨酸是由两分子的半胱氨酸通过它们的—SH 基团氧化形成二硫键构成的。如此的氧化过程就是蛋白质的翻译后修饰，这对某些蛋白质折叠结构的稳定性是重要的。因此，在翻译过程中绝没有胱氨酸被组入多肽中，并且，也没有与其相应的密码子。

17.34　从细胞输出的蛋白质的信号序列从不位于该多肽链的 C 端。为什么?

录物的加工（修饰和剪切）而生成的。

转录的抑制剂

17.20　放线菌素 D 能阻断 rRNA、tRNA 基因和那些编码蛋白质产物的基因的转录吗？

答：

是的。放线菌素 D 能阻断与 DNA 模板结合的转录过程。为此，它识别全部双链 DNA 的普通的结构特征，通过嵌入叠在一起的碱基之间（第 16 章）与 DNA 结合。

17.21　细菌 RNA 聚合酶的抑制剂利福霉素和利迪链菌素均结合在酶的相同亚单位，但它们对该酶活性所有的影响却是不同的。这是为什么？

答：

这些抑制剂的每一个都特异地与 RNA 聚合酶的 β 亚单位结合。该亚单位与 RNA 链的起始和延伸有关。利福霉素与该亚单位结合只影响起始步骤；它对延伸没有影响。而利迪链菌素结合后将阻断这两个步骤的活性。

mRNA 翻译的装置

17.22　细胞中有多少种类的 rRNA 和 tRNA 在翻译过程中起作用？

答：

最多有 3～4 种的 rRNA，这依赖于它们是细菌还是真核生物。另一方面，在任何细胞中，至少有 20 种 tRNA（对于每一个氨基酸至少有一个）。

17.23　对于所有的 tRNA，为什么它们必需具有相似的空间大小？

答：

所有的 tRNA 必需具有相似的空间大小，这是因为：在翻译过程中，所有负荷的 tRNA 与核糖体上的相同的位点单独地严格地相互作用。存在于 tRNA 一端的反密码子允许它与结合的 mRNA 相互作用，并且参照结合的肽基转移酶的位置，氨基酸严格地定位在核糖体的表面。

17.24　一个具体的 tRNA 能适应所有的亮氨酸密码子吗？

答：

亮氨酸有六个密码子，在所有的氨基酸中是最多的。依据摆动学说，一个具体的 tRNA 可适应一个以上的密码子。摆动学说允许多至三个不同的核苷酸（但只在密码子的第三个位点）同反密码子的一个核苷酸相互作用。亮氨酸有六个密码子的事实意味着它们必须在除了第三个碱基以外的位置上存在不同，因此，一个特定的 tRNA 分子的一个具体的反密码子不能与它们相适应。

17.25　氨基酰-tRNA 合成酶在两个步骤中起作用致使氨基酸与其同源 tRNA 结合。在这些步骤的每一个步骤中，氨基酰-tRNA 合成酶对于氨基酸或其 tRNA 具有特异性吗？

答：

在第一个步骤（氨基酸活化）中，该酶识别其相应的氨基酸。在第二步，该氨基酸必须与其正确的 tRNA 结合，因此，后者被该酶识别是致关重要的。（有时，也会低频率地发生这样的情况，一个相似但非正确的氨基酸在第一个步骤被编入；当该酶识别其相应的 tRNA 时，该非正确的氨基酸被释放出来。）

细菌中 RNA 的翻译

17.26　什么是细菌 mRNA 的“前导”区域？

答：

该前导是位于起始密码子和 RNA 5′端的区域。它含有与核糖体结合有关的不被翻译的序列；与核糖体结合是把信息翻译进多肽的一个重要的步骤。

17.47　只有转录起始过程需要 RNA 聚合酶的 σ 亚单位。(a) 对；(b) 错。

17.48　转录的终止序列是在转录物的 5′端还是 3′端？

17.49　单顺反子 mRNA 能表示细菌细胞的初级转录产物吗？

17.50　增强子序列存在于细菌中还是真核生物中？

17.51　组蛋白的磷酸化能减少还是增加该分子的净正电荷？

17.52　真核生物基因一般由内含子和外显子构成。这些序列都被转录和翻译吗？

17.53　剪切过程发生在 DNA、RNA 或多肽中吗？

17.54　RNA 带帽过程发生在剪切过程之前还是之后？

17.55　一个外显子能含有起始密码子吗？

17.56　利福霉素抑制组蛋白基因的转录吗？

17.57　在什么种类的 RNA 中存在密码子和反密码子？

17.58　密码子只有三个核苷酸残基的长度，为什么 tRNA 分子却如此之大？

17.59　tRNA 是单链分子，但其分子结构的大部分是双螺旋结构。这是如何形成的？

17.60　tRNA 分子的受体干含有的是 3′端还是 5′端？

17.61　在一个细胞中，有许多种类的氨基酰- tRNA 合成酶或 tRNA 吗？

17.62　核糖体的哪个亚单位识别 mRNA 上不翻译的前导序列？

17.63　细菌中 70S 起始复合物形成后，在翻译的哪一步能量是以高能磷酸键的形式消耗的？

17.64　终止密码子与转录的终止有关还是与翻译的终止有关？

17.65　在真核 mRNA 上，甲基化的帽子与 RNA 结合过程发生在细胞核内还是在细胞质内？

17.66　胰岛素基因的第一个转录产物是什么？

17.67　信号肽酶裂解 mRNA 非翻译前导序列吗？

17.68　细菌的阻抑物结合在启动子上还是结合在 DNA 靠近基因的操纵基因位点上？

17.69　阻抑物和与转录有关的辅阻抑物之间有什么差别？

答：

这是因为：如其被设计的那样，多肽链通过膜时需要该信号序列。C 端部分总是被最后合成，如果信号序列位于这个末端将不能使生长的多肽链“成线状”通过膜。

翻译抑制剂

17.35　为什么在细菌和真核生物中嘌呤霉素均可作为翻译抑制剂发挥其作用？

答：

嘌呤霉素与氨基酰-tRNA 的 3′端的结构相似（特别是苯丙氨酰-tRNA），在翻译过程中嘌呤霉素与其竞争。在所有生物中，氨基酰-tRNA 的 3′端的结构是相同的。

17.36　氯霉素在作为抗生素治疗动物的细菌感染时有副作用。其原因何在？

答：

氯霉素通过抑制核糖体大亚单位肽基转移酶可阻断细菌的翻译过程。它不妨碍真核生物核糖体大亚单位的肽基转移酶。然而，动物细胞线粒体中的核糖体与细菌核糖体相似，氯霉素可阻断该细胞器的蛋白质合成。这是该药物用于动物治疗时副作用产生的原因。

基因表达调控

17.37　为什么说大肠杆菌乳糖操纵子表达调控是负调控的例子？

答：

这是因为：该表达调控是通过弱化负作用剂（即阻抑物）的效应而起作用的。换句话说，乳糖操纵子表达是通过消除阻抑物的影响而实现的。另一方面，在正调控系统中，表达是通过某一物质的直接作用正向诱导或增加表达而实现的。

17.38　在染色体不相邻排列的一些基因表达的协同调控（在转录水平）需要什么？

答：

每一个基因需要一个共同的与其相关的调节单元（启动子，或操纵基因，或二者共同）。以此方式，诸如阻抑物或正向作用物质的单一调控因子可同时影响所有基因。

17.39　网织红细胞珠蛋白合成的转录调控是不可能的，因为在这类细胞中不存在转录过程。这是否意味着珠蛋白合成的整个调控过程完全缺乏转录调控？

答：

不。在红细胞生成的过程中，网织红细胞从其前体形成之前（第 1 章），必须有一个预先的珠蛋白基因的转录过程产生富含珠蛋白 mRNA 的网织红细胞。

补充问题

17.40　把下列 RNA 序列译成相应的氨基酸序列：CAU AUU ACU CAU GAA CGU GAA

17.41　下列为一个真核 mRNA 编码序列的开始部分，它编码的氨基酸序列是什么？

GUG UUU UUU GUG UUU

17.42　下列双链 DNA 片段包含一个蛋白质起始密码子的区域，请辨认摸板链：

5′-GATGTCTCCT-3′

3′-CTACAGAGGA-5′

17.43　细胞中数量最多的 RNA 类型是什么？

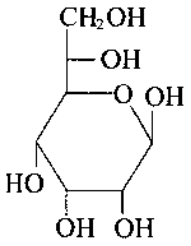
17.44　DNA 聚合酶需要一个引物（在其上结合新的核苷酸单元使其链延伸）。引物对 RNA 聚合酶的作用是必需的吗？

17.45　对于 RNA 合成或多肽合成的起始过程，那一个需要启动子？

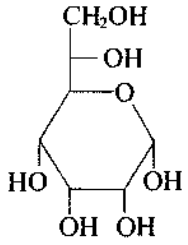
17.46　Pribnow 框存在于起始密码子上游 35bp 附近。(a) 对；(b) 错。

2.14

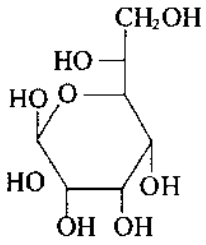
(a)



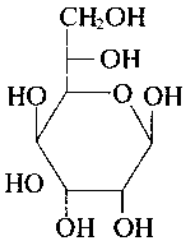
(b)



端基异构体（异头体）

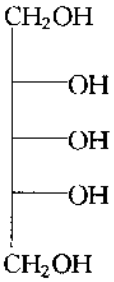


对映体

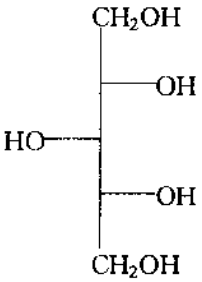


差向异构体

2.15



和

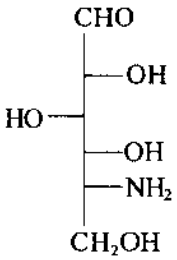


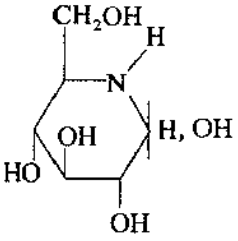
2.16　α（28%）；β（72%）。

2.17　0.167g cm^{-3}。

2.18　果糖是（－）。

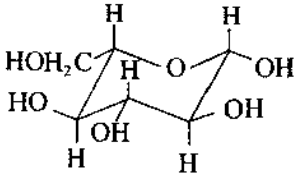
2.19



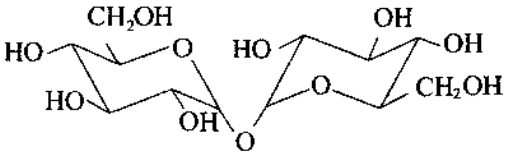


2.20　六。

2.21　β－L－吡喃葡萄糖的取代全是在那些β－D－吡喃葡萄糖 Haworth 结构的对位上（即：它们所在位置是β－D－吡喃葡萄糖中的 H 所占据的位置）。因此，依据例 2.13，可以看为：在 1C 椅构象体中，所有β－L－吡喃葡萄糖的取代均是平伏向的。

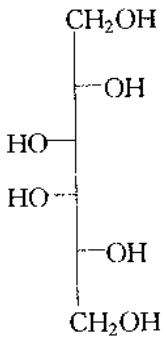


2.22

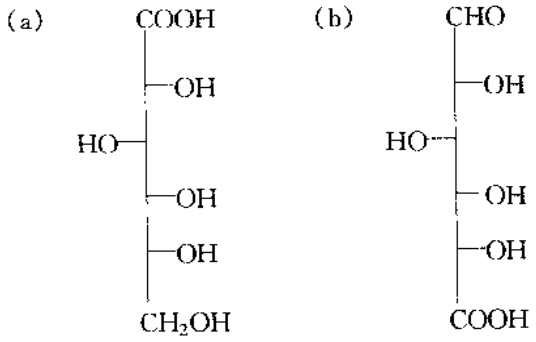


2.23　赤藓糖醇对称性的，并且两个手性碳原子是等价的。

2.24

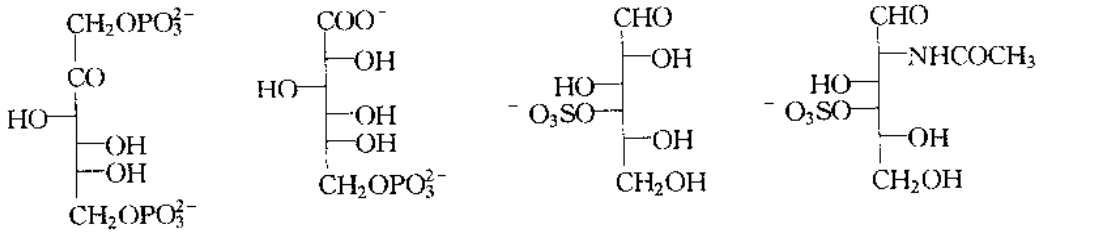


2.25



2.26 C-5 的转化。

2.27



果糖-1，6-二磷酸　　6-磷酸葡萄糖酸　　D-半乳糖-4-硫酸　　*N*-乙酰半乳糖胺-4-硫酸

2.28 不；L-岩藻糖和 L-鼠李糖是脱氧己糖。

2.29 异构体。

第 3 章

3.18 (a) 丝氨酸，苏氨酸（—OH）；天冬酰胺，谷氨酰胺（—NH_2）；半胱氨酸（—SH）；酪氨酸（—OH）；天冬氨酸，谷氨酸（—COOH）；赖氨酸，组氨酸，精氨酸（—NH）。

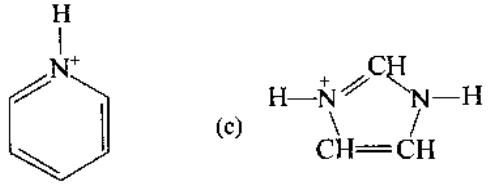
(b) 丝氨酸，苏氨酸（—OH）；天冬酰胺，谷氨酰胺（—NO—）；半胱氨酸(—S—)；酪氨酸（—O—）；天冬氨酸，谷氨酸（—COO^-）；赖氨酸，组氨酸，精氨酸（通常为非质子化形式）。

3.19 苯丙氨酸，酪氨酸，色氨酸。

3.20 甘氨酸。

3.21

(a) $HO—CH_2—CH_2—SH$;　　(b)　　(c)



3.22　pI = 10.75

3.23　pI = 7.6

3.24　pH = 2.35

3.25　(a) 1.61; (b) 1.0; (c) −0.15

3.26　(a) 0.98; (b) 0.06; (c) −0.94

第 4 章

4.21　(a) 肌动蛋白，肌球蛋白，原肌球蛋白，肌钙蛋白，肌红蛋白；(b) 胶原蛋白；(c) 角蛋白。

4.22　17 000。

4.23　(a) 阳极
(b) pH3.0 阴极；pH9.0 阳极。
(c) pH4.5 阴极；pH9.5 稳定；pH11.0 阳极。
(d) pH3.5，7.0，9.5，阳极。

4.24　醛缩酶（第一个），血清白蛋白，血红蛋白，β-乳球蛋白，核糖核酸酶。

4.25　这些定义见 4.4 部分。

4.26　(a) 表面：组氨酸，精氨酸，谷氨酰胺，谷氨酸；这些是极性的或带有电荷的。
(b) 内部：蛋氨酸，苯丙氨酸，缬氨酸；这些是非极性的。另外，谷氨酰胺和不带电荷的组氨酸若形成氢键的话也可存在于内部。

4.27　(a) 表面的非极性基团可构成与其他分子结合的位点。
(b) 内部的带电荷基团在某些酶的催化机制方面是重要的。

4.28　结构域是蛋白质的一个独立的折叠区域，例如：甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 NAD^+ 结合位点。

4.29　这样的构象可导致原子之间的冲突。

4.30　(a) 高浓度的尿素（6～8mol/L）可削弱氢键和疏水相互作用。
(b) 尿中的尿素非常稀（约 0.2mol/L）。

4.31　(a) 氢键，疏水相互作用，van del Waals 相互作用，电荷-电荷相互作用。
(b) 它们相互协调作用。

4.32　(a) p = 0.54nm，d = 0.15nm。
(b) 153 × 0.15nm = 22.95nm。
(c) 153 × 0.35nm = 53.55nm。
(d) 153 × 0.36nm = 55.08nm。

4.33　(a) α-螺旋
(b) α-螺旋（弱）
(c) 紊乱（电荷相斥）
(d) α-螺旋（弱）
(e) α-螺旋
(f) 可能紊乱

4.34　氢键，疏水相互作用，电荷-电荷相互作用，van der Waals 相互作用。

4.35　脯氨酸太大不能与第 3 位的残基充分接近。

4.36　甘氨酸较小，可与第 3 位残基充分接近。

4.37　(a) 胰岛素有两条链，来自一个单链前体裂解；通过二硫键保持其稳定。
(b) 血红蛋白有四条链，两条 α 和两条 β；通过非共价相互作用聚合在一起。
(c) 胶原蛋白有三条链，形成三重螺旋；通过氢键和额外的化学交联使其稳定。

4.38　最大限度的氢键形成；所有键长和角均为正常；在骨架原子之间没有相斥作用（即：α-螺旋做图位于拉氏图的有利区域）。

4.39　(a) 不同：α-螺旋中的氢键在同一链的肽键之间形成；在 β-折叠片层结构中，氢键在不同链的肽键之间形成。氢键平行于 α-螺旋的轴，而在 β-折叠片层结构中氢键垂直于链的方向。

(b) 相似：α-螺旋和β-折叠片层结构是规则的，重复结构，通过氢键使其稳定，做图位于拉氏图的有利区域。

第5章

5.19 (a) 10^{-3}mol/L；(b) 1mol/L；(c) 10^{-2}mol/L。

5.20 (a) 24%；(b) 98.4%。
注意：由于平衡常数升高，二聚体百分数增加。

5.21 (a) 0.65
(b) 0.025
(c) 0.04
(d) 0.74
(e) 0.48

5.22 由于氯离子强化盐键，血红蛋白的氧亲和力降低。因此，在氯离子的存在的情况下，更多的氧被释放。

$$Hb(O_2)_4 + Cl^- \rightleftharpoons Hb(Cl^-) + 4O_2$$

5.23 氧亲和力减少（p50是70托，动脉血只有70%被饱和）

5.24 多肽（b）和（c）将形成三重螺旋，（b）更为稳定。

5.25 由于胶原蛋白多肽链几乎完全伸展，它们再被拉伸将使共价键断裂。α螺旋通过裂解若弱的非共价氢键可使其延长一倍。

5.26 (a) 6；(b) 4。

5.27 羟基磷灰石结合在胶原蛋白分子的沟槽中，这与电镜中用重金属染色的方式相同。

5.28 蛋白酶裂解最靠近透明质酸的区域中的核心蛋白质和键，至此糖胺聚糖的保护最小。

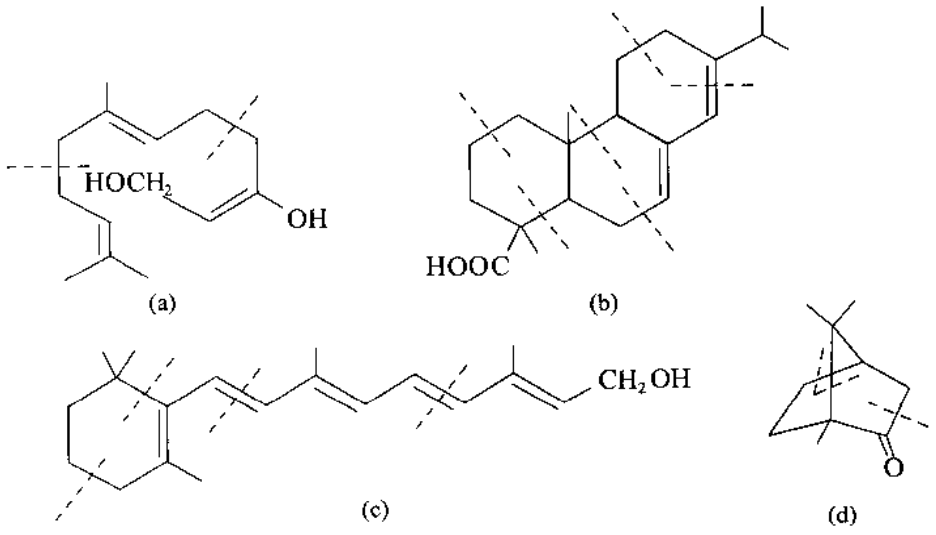
5.29 9 400。

5.30 中等纤维是细胞特异性的，当细胞被转化时它也不发生变化。因此，通过鉴别存在于肿瘤中的中等纤维类型，一个微小的转移特征和起源可以被确定。

5.31 动力蛋白以非活性形式开始于轴突的正端，通过驱动蛋白将囊泡在微管上运输。一旦在轴突末端，动力蛋白转换为活性形式，就可将囊泡运送回细胞体。

第6章

6.13



6.14　(a) 含有碳水化合物的脂类；

(b) 6 - α - D -吡喃半乳糖- β - D -吡喃半乳糖甘油二酯（糖甘油脂）和半乳糖神经酰胺（鞘糖脂）。

6.15　因为它们是二碳化合物乙酸的多聚体。

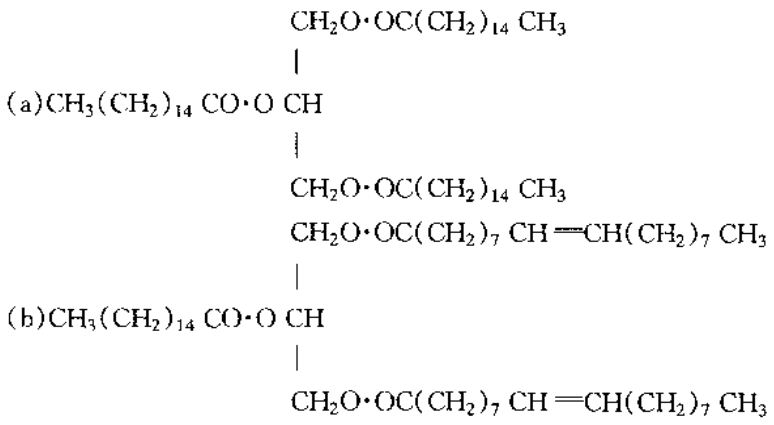
6.16　(a)$CH_3(CH_2)_{12}COOH$

(b)$CH_3(CH_2)_3CH{=\!=\!=}CH(CH_2)_7COOH$

(c)$CH_3(CH_2)_5CH(OH)CH_2CH{=\!=\!=}CH(CH_2)_7COOH$

6.17　64（如果这三个脂肪酸总是不同，24）

6.18



(a)$CH_3(CH_2)_{14}CO\cdot O\ CH$

$CH_2O\cdot OC(CH_2)_{14}CH_3$

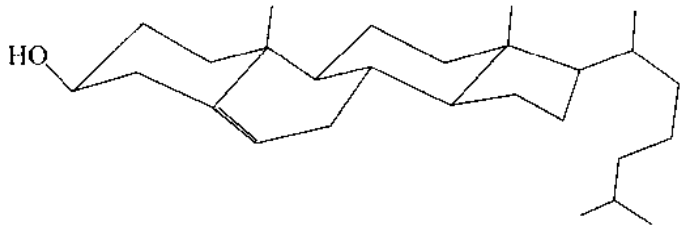
$CH_2O\cdot OC(CH_2)_7CH{=\!=}CH(CH_2)_7CH_3$

(b)$CH_3(CH_2)_{14}CO\cdot O\ CH$

$CH_2O\cdot OC(CH_2)_7CH{=\!=}CH(CH_2)_7CH_3$

6.19　对于阳极：PG、DPG、PS；固定的：PE。

6.20



6.21　磷脂酸。

6.22　2.86×10^6。

6.23　计算的一个红细胞表面积乘以 4.74×10^9 得到一个总面积，该总面只约为观察到的面积的一半。因此，由于是双层，实际的脂类含量应是由单层计算得到的数据的一倍。

6.24　PE 有一个比 PC 极性小的头部，并被完整的包裹进凹陷的内表面。

6.25　(a) 降低；(b) 升高；(c) 升高转换温度。(a) 增加；(b) 减少；(c) 减少磷脂的流动性。

6.26　$1.04gcm^{-3}$

6.27　120。

6.28　1 -丙醇（最快），1，3 甘油醛，丙酰胺，丙酸，丙氨酸。

6.29　答案应基于例 6.9 和图 6 - 10 提供的材料，在例 6.12 中有介绍。

6.30　3 300cpm/min。

6.31　35.5kJ/mol。

6.32　(a) 没有影响；(b) 运输被抑制。

6.33　Ca^{2+} 的释放被抑制。

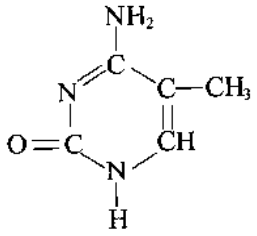
第 7 章

7.35　结构 (a) 是嘧啶，(c) 是嘌呤。

7.36 (a) RNA：腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶和胞嘧啶。

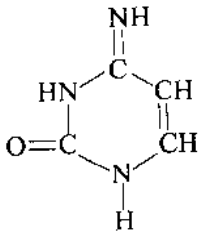
(b) DNA：腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶。

7.37 (a)

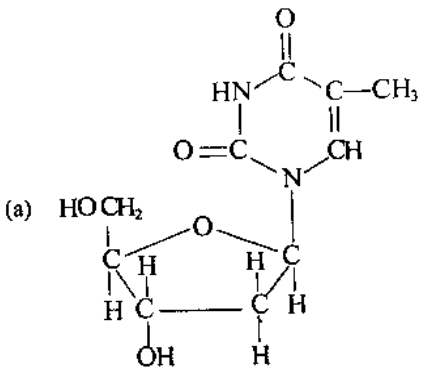


(b) 大多数 DNA 含有 5-甲基胞嘧啶的量非常少。

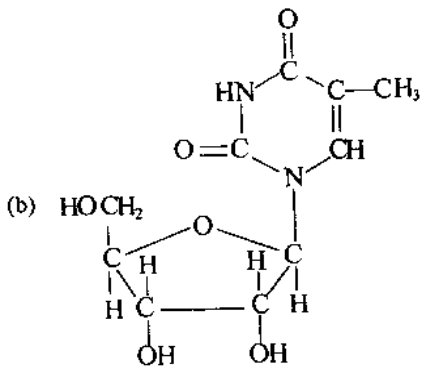
7.38



7.39



脱氧核糖胸苷

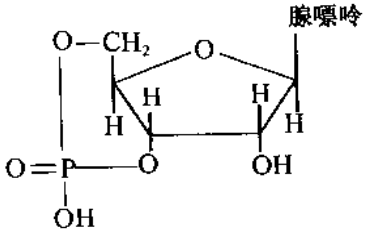


核糖胸苷

7.40 腺苷。

7.41 核苷酸含有磷酸基团；核苷不含有。

7.42



7.43 (b) 脱氧鸟苷一磷酸

7.44 因为它含有尿嘧啶，正常情况下不存在于 DNA 中。

7.45 抵抗较小。

7.46　序列互补性是一条 DNA 序列与另一个配对，即：两条链形成互补碱基对的能力。

7.47　B 型是右手螺旋；Z 型是左手螺旋。在 B 型中重复单位是单核苷酸，而 Z 型中的重复单位是二核苷酸。Z 型的糖磷酸骨架是锯齿状的，而 B 型是较平滑的。

7.48　在高离子强度下，正电荷离子减少 DNA 上的负电荷，这降低了结构中静电压力，使其结构更为稳定。

7.49　因为细菌基因组比真核基因组要小，所以，前者 DNA 中存在较高的非重复序列。复性是二分子反应，当反应物以高浓度存在时，复性将进行的更快。

7.50　序列的复杂性指基因组中存在的序列的多样性。

7.51　染色体是指一种结构单位，在该结构单位中细胞的遗传物质（即 DNA）被聚集。基因组是指细胞的全部的遗传物质，它由一个以上的染色体构成。

7.52　核心组蛋白在真核细胞中包绕着 DNA，形成可抵抗核酸酶的颗粒。连接组蛋白与 DNA 结合并连接着上述的颗粒，该区域对核酸酶敏感。

7.53　它们含有高比例的正电荷氨基酸残基，这些残基与带负电荷的 DNA 形成静电相互作用。

7.54　(a) DNA 螺旋过度盘曲形成正超螺旋；螺旋的不充分盘曲形成负超螺旋。(b) 松弛是指超螺旋的去除。(c) 它通过在 DNA 单链或双链形成切口而实现。

7.55　DNA 含有脱氧核糖作为糖的部分，以胸腺嘧啶作为四个碱基之一。RNA 含有核糖作为糖的部分，以尿嘧啶作为四个碱基之一。

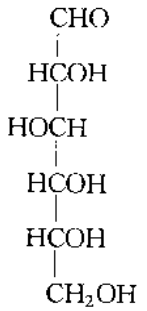
7.56　因为它是从比其他类型 RNA 大得多的基因组部分被转录（形成）的。

7.57　(c) GTAATC 序列将最不容易被切断，这是由于它没有两倍的旋转对称。

第 8 章

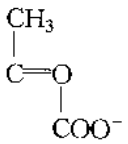
8.14

(a) 葡萄糖



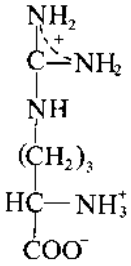
葡萄糖 6-磷酸酶是水解酶，EC3.1.3.9。

(b) 丙酮酸



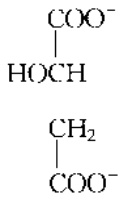
乳酸脱氢酶是氧化还原酶，EC1.1.1.27。

(c) 精氨酸



精氨琥珀酸酶是裂解酶，EC4.3.2.1。

(d) 苹果酸



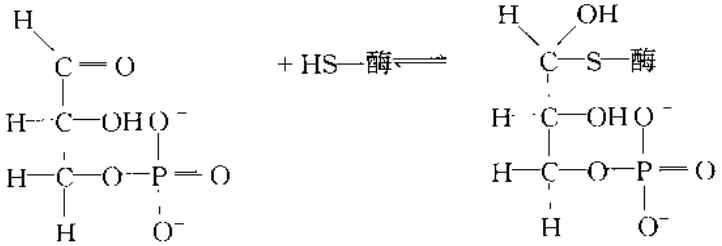
延胡索酸酶是水合酶，EC4.2.1.2。

8.15 (a) 乙醇＞甲醇＞丙醇＞丁醇＞环己醇＞酚

(b) 乙醇是“最好”的底物；甲醇太小，而其余的太大或疏水性太强，致使它们不能很好地进入活性部位。

8.16 (a) 硫代半缩醛。

(b)



8.17 (a) 变位酶是 EC 类 5 的成员，即：异构酶。类 5 的酶催化一个分子内的几何结构变化。当异构作用涉及一个基团的分子内转移，该酶称为变位酶。例如：磷酸葡萄糖变位酶和分支酸变位酶。

(b) 这三个类型的酶均是 EC 类 1 的成员；氧化还原酶。这类酶氧化/还原反应，系统名称为氢供体：受体氧化还原酶。推荐的名字是脱氢酶，或还原酶。氧化酶只用于氧分子作为受体的情况。脱氢酶的一个例子是乳酸脱氢酶，该酶催化由乳酸和 NAD^+ 形成 NADH 和丙酮酸。氧化酶的一个例子是胆碱氧化酶（EC 1.1.3.4），它催化由氧和胆碱形成甜菜碱和 H_2O_2。

8.18 在人类，红细胞流过肺泡毛细血管所需的时间约为 0.3 秒。在该时间内，血浆中的 HCO^- 必须重新进入红细胞，并脱水形成 CO_2，然后 CO_2 扩散通过红细胞和毛细血管膜进入肺泡（并排入大气）。这种自发的脱水反应简单，但较慢。

8.19 酶作用于底物类似物，该类似物修饰活性部位，并永久地对它进行抑制。

8.20 不。游离底物和产物的比例将是相同的，但底物和与酶结合的产物必须计算在内。

8.21 对这个问题没有惟一的简单的答案。可能的原因是：(1) 为结合和催化提供“正确”的化学环境，如：降低基团的 pK_a，(2) 吸收水扩散（热的）运动产生的能量，并将它输进活性部位用以增加催化速度，(3) 通过效应物结合在酶的其他位点所诱导的构象变化来控制催化，(4) 使得酶在膜中的固定，或组构成大的复合物，(5) 防止它们通过膜过滤而丢失，如：肾脏中。

8.22 DNA 聚合酶（第 16 章），糖原磷酸化酶（第 11 章）。

第 9 章

9.24

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0}$$

$$v_0(K_m + [S]_0) = V_{max}[S]_0$$

$$\frac{v_0(K_m + [S]_0)}{[S]_0} = \frac{V_{max}[S]_0}{[S]_0}$$

$$\frac{v_0 K_m}{[S]_0} + v_0 = V_{max}$$

$$v_0 = V_{max} - \frac{v_0 K_m}{[S]_0}$$

9.25　由（$v_{0,i}/[S]_{0,i}$，$v_{0,i}$）构成的成对数据做图，给出斜率为 $-K_m$ 和纵坐标截距为 V_{max}的一条直线。

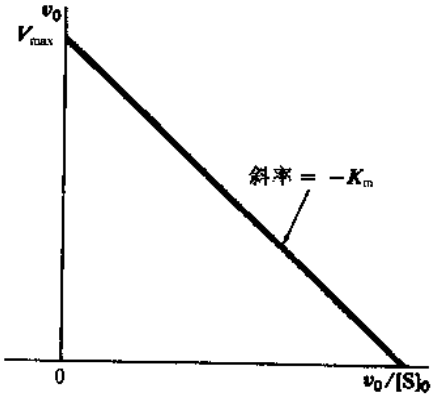


图 A-1　Eadie-Hofstee 图

9.26　用 $[S]_0$ 乘以 Lineweaver-Burk 方程式等号的两侧。

9.27　由（$[S]_{0,i}$，$[S]_{0,i}/v_{0,i}$）构成的成对数据做图，给出斜率为 $1/V_{max}$和横坐标截距为 $-K_m$ 的一条直线。

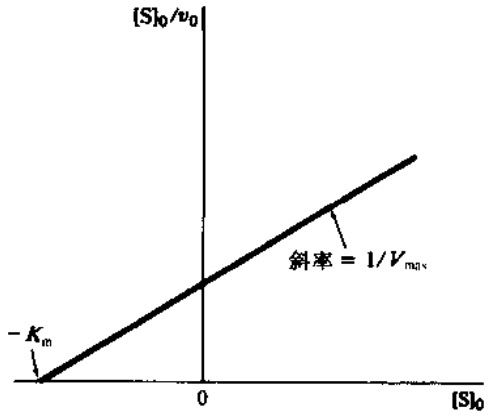


图 A-2　Hanes-Woolf 图

9.28　(a) 记住：使用倒数。(b) 不。

9.29　(a) 分解变量，求和。那么：

$$V_{max}t = [S]_0 - [S]_t + K_m \ln([S]_0/[S]_t)$$

(b) 为了简单的做图步骤，方程式被重新排列为：

$$\frac{1}{t}\ln([S]_0/[S]_t) = -\frac{1}{K}\left(\frac{[S]_0 - [S]_t}{t}\right) + \frac{V_{max}}{K_m}$$

左侧对 $[S]_0 - [S]_t/t$ 做图，斜率为 $-1/K_m$，纵轴截距为 V_{max}/K_m，横轴截距为 V_{max}。

9.30　(a) 分解变量，注意：$[I] = [P] = [S]_0 - [S]$；然后求和：

$$V_{max}t = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)([S]_0 - [S]) + K_m \ln([S]_0/[S])$$

(b) 对于一个固定的 $[S]_0$ 值和一个 [I] 值范围，使用上述 9.29 给出的做图分析，

可获得一系列斜率相同而纵截距和横截距不同的线。横截距的倒数对 [I] 做的二次图斜率为 $1/K_I$。

9.31 考虑：

$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m \frac{[1 + ([S]_0 - [S])]}{K_I}} + [S]$$

如果 $K_I = K_m$，那么：

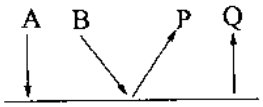
$$\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m \frac{[K_m + ([S]_0 - [S])]}{K_m}} + [S]$$

分子中 K_m 约分后，由此可直接求和得到结果。

9.32 使用任何做图步骤。$K_m = 0.8\mu mol/L$；$V_{max} = 3\mu mol/L/min$；并从表达式：

$$V_{max} = k_{cat}[E]0, k_{cat} = 300/s。$$

9.33 (a)



(b) 使用 King-Altman 程序推导速度表达式。关系遵循例 9.6 中使用的那些根据。

9.34 这是一个重要的问题，已被许多酶动力学家谈论了多年。为了正确应用 Briggs-Haldane 稳态分析，在闭合系统中，$[S]_0$ 必须是≫ $[E]_0$，此处的≫记号表示一个至少是 1 000 的因子。Chaplin 1981 年注意到：表达式 $v_0 = V_{max}[S]_0/(K_m + [S]_0 + [E]_0)$，在 $[S]_0 = 10\times [E]_0$ 和 $[S]_0 = 0.1K_m$ 时估计 v_0 的过程中，只有 1% 的错误。该表达式可在比简单的 Michaelis-Menten 方程式更宽松的条件下应用。在开放系统中，$[S]_0$ 可接近 $[E]_0$，并且可适合酶-底物复合物的稳态；两类系统的计算机模拟是获得稳态复合物所需条件的最好的方法。

9.35 (a) $1/9K_m$；(b) $1/3K_m$；(c) K_m；(d) $9K_m$。

9.36 微分方程式 (9.36)。

9.37 (a) −7；(b) −10；(c) 81。

9.38 是。如果 $0 < n < 1$，数据符合负协同作用的酶或结合蛋白质；这可使用题 9.21 的分析来说明，并且，在 $1/n > 1$ 时，$(81)^{1/n} > 81$。

9.39

$$Y = \frac{K_1[X] + K_1K_2[X]^2}{1 + 2K_1[X] + K_1K_2[X]^2}$$

第 10 章

10.12 使用题 10.3 中的关于活性的方程式和活性系数。见图 A－3。

10.13 $\Delta G^{0'} = 219.9kJ/mol$。

10.14 在生物化学标准态条件下，ATP 合成的自由能可由下列表达式给出：

$$\Delta G^{0'} = -nF\Delta p$$

此处的 n 为每个合成的 ATP 分子被移位的质子数量；Δp 是质子驱动力。代入 $\Delta G^{0'}$ 值和 n 值，给出：

$$\Delta p = -0.158\ V$$

Δp 由表达式给出：

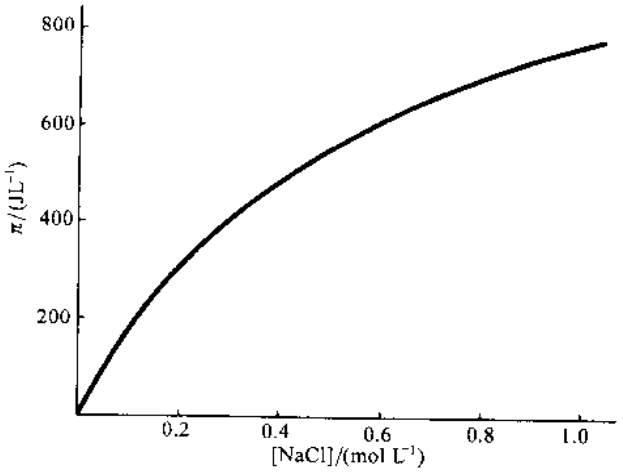


图 A-3

$$\Delta p = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F}\Delta\mathrm{pH}$$

这是方程式（10.35），在该方程式中两侧以 F 来除。

$\Delta\mu = \Delta p \cdot F$

所以，　　$\Delta\mu = -15.25\mathrm{kJ/mol}$

10.15　(a) 0.03；(b) 0.15；(c) 0.3；(d) 3.0

10.16　使用方程式（10.10）。

10.17　(a) $\Delta G^{0'}_{\mathrm{pH}=x} = \Delta G^{\circ} + RT\ln(10^{-x})$

(b) 使用这个方程式计算 $\Delta G'_{\mathrm{pH}=7}$ 的 ΔG^0 值，我们得到 $\Delta G^{0'}_{\mathrm{pH}=6} = 23.2\mathrm{kJ/mol}$。

10.18　(a) $\Delta S^0 = 92.2\ \mathrm{Jk^{-1}mol^{-1}}$。

(b) 如果假设：ΔH^0 和 ΔS^0 在 298～323K 范围不依赖温度，那么，在 323K 的平衡常数是 1.756×10^{-5}。

10.19　(a) 和 (b)。

10.20　在高 $[S_i]$，$v_i - k_{cat_i}[E_i]$。

10.21　考虑酶 E_1 到 E_n 的链，

$$S_1 \xrightarrow{E_1} S_2 \xrightarrow{E_2} S_3 \cdots\cdots S_n \xrightarrow{E_n} S_{n+1}$$

伴有 V_{max} 和 K_m 的各种值。假设该系统是在稳态中并有稳定的 v_g 流通过它。在假设的实验中，如果以同样小的因子 α（即：$\Delta[E_i]/[E_i] = \alpha$）增加所有的酶浓度（假设酶活性与其浓度成比例），$v_g$ 中的分数变化将是确切的 α：

$$\alpha = \Delta v_g / v_g$$

所提供的 α 非常小，$\Delta v_g/v_g$ 是所有的每个独立酶改变引起的个体变化的总和。对于第 i 个酶，控制系数定义为 C_i（见题 10.20）；所以，

$$C_i = \left(\frac{\Delta v_g}{v_g}\right)_i \Big/ \frac{\Delta[E_i]}{[E_i]}$$

$$= \left(\frac{\Delta v_g}{v_g}\right)_i \Big/ \alpha$$

$$\alpha C_i = \left(\frac{\Delta v_g}{v_g}\right)_i$$

该方程式的和为：

$$\frac{\Delta v_g}{v_g} = \sum_{i=1}^{n}\left(\frac{\Delta v_g}{v_g}\right)_i = \alpha\sum_{i=1}^{n} C_i$$

但是，从以上的第 1 个方程式 $\alpha = \Delta v_g / v_g$；因此：$\sum_{i=1}^{n} C_i = 1$。

第 11 章

11.12 在糖酵解过程中，3-磷酸甘油醛被转换为 1,3-二磷酸甘油酸，腺苷酸激酶反应的平衡倾向于 3-磷酸甘油酸，所以，该代谢产物被“贯穿”该反应途径。

11.13 2,3-二磷酸甘油酸通过 2,3-二磷酸甘油酸合成酶催化的反应由 1,3-二磷酸甘油酸合成。2,3-二磷酸甘油酸磷酸酶催化 2,3-二磷酸甘油酸水解形成 3-磷酸甘油酸。

11.14 其中两个碳原子被转化为二氧化碳，其他四个碳原子形成两分子的乙醇。

11.15 四。

11.16 利用磷酸戊糖途径它可被组入糖原，或被水解为葡萄糖。

11.17 白蚁肠微生物合成并分泌纤维素酶，该酶水解纤维素。

11.18 (a) 乙醇发酵：葡萄糖被转化为丙酮酸，它可形成二氧化碳和乙醇，而 NAD^+ 被重新生成。(b) 抑制物将阻断糖酵解，且酵母将死亡。

11.19 (a) 胰岛素促进葡萄糖从血液到细胞的吸收。过量的葡萄糖在肝脏中被转化为葡萄糖 6-磷酸（通过葡萄糖激酶），然后以糖原的形式储存。
(b) 胰高血糖素促进肝脏中的糖原降解，生成葡萄糖以保持血液中适当的浓度。

11.20 血液中的葡萄糖浓度在餐后较高，大多数葡萄糖将被排到尿中。葡萄糖代谢将启动，因此，在一个比正常较低的水平。

11.21 磷酸戊糖途径可生成必须的 NADPH；5-磷酸核糖将被转换为糖酵解中间产物 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛。

11.22 糖酵解，磷酸戊糖途径，糖原生成，葡萄糖形成（6-磷酸葡萄糖）。

第 12 章

12.12 (a) 柠檬酸循环：2；(b) 乙醛酸循环：0。

12.13 延胡索酸是延胡索酸酶的底物，而顺丁烯二酸不是。细胞不能利用顺丁烯二酸作为碳源。

12.14 没有。红细胞没有线粒体，因此没有运作柠檬酸循环的酶。

12.15 抑制物可阻止柠檬酸循环运作，但发芽的植物细胞中的乙醛酸循环将不受影响。因此，在这两类细胞中能量的生成将会减少，但它们合成葡萄糖的能力可不受影响。

第 13 章

13.17 胆固醇是胆汁盐的前体，它在食入食物后以及消化和吸收甘油三酯过程中被刺激分泌进肠道。

13.18 在磷脂酰胆碱的再合成过程中甲基被利用，对于二酰甘油的合成，该过程减少 1,2-二酰甘油的利用。

13.19 1 克分子的软脂酸通过 β-氧化和柠檬酸循环彻底氧化为二氧化碳和水生成 NADH 和 $FADH_2$。在这些过程中形成的 NADH 和 $FADH_2$ 的氧化与 ATP 的合成偶联在一起（第 14 章）。每克分子的软脂酰-CoA 被氧化，合成 131 克分子的 ATP。但，有两个 ATP 的高能键被用于软脂酰-CoA 的生成，所以，净生成 129 个 ATP。

13.20 (a) 乙酰乙酸通过 2 克分子乙酰 CoA 进入柠檬酸循环被彻底氧化；从该循环形成的 NADH 和 $FADH_2$，每克分子乙酰乙酸可合成 22 克分子的 ATP。额外的 2 克分子

ATP 来自也在该循环过程中形成的 2 克分子的 GTP。因此，总数为 24 个。

(b) 3-羟丁酸被 β-氧化氧化为乙酰 CoA，乙酰 CoA 进入柠檬酸循环；从该循环形成的 NADH 和 $FADH_2$，每克分子 3-羟丁酸可合成 25 克分子的 ATP。额外的 2 克分子 ATP 来自也在该循环过程中形成的 2 克分子的 GTP。因此，总数为 27 个。

13.21 (a) 软脂酸和亚油酰甘油；(b) 花生四烯酸。

13.22 葡萄糖在磷酸戊糖途径中被氧化（第 11 章），生成的 NADPH 可参加胆固醇的合成。每分子羊毛固醇的合成需要一分子的葡萄糖（将羊毛固醇转化为胆固醇的反应是第 13 章范围之外的内容。）。

13.23 通过 β-氧化。

13.24 葡萄糖在糖酵解中被转化为二羟丙酮磷酸（第 10 章），然后二羟丙酮磷酸被 NADH-依赖的 3-磷酸甘油脱氢酶还原为 3-磷酸甘油。

13.25 乙酰 CoA 羧化酶在胞质中有两种形式，一个是单体而另一个是多聚体。柠檬酸可将非活性形式（单体）转化为活性形式（多聚体），长链的乙酰 CoA 是一个反馈抑制物，它可将活性形式转化为非活性形式。

13.26 转氨基反应形成的丙酮酸，生酮氨基酸碳骨架降解之前的脱氨基作用形成乙酰 CoA（见第 15 章）。

13.27 乙酰 CoA 脱氢酶，烯酰 CoA 水合酶，3-羟乙酰 CoA 脱氢酶，硫解酶，Δ^3-顺-Δ^2-反-烯酰 CoA 异构酶。

13.28 脂肪库提供脂肪酸作为细胞燃料。脂肪酸氧化形成 NADH 和 $FADH_2$，它们被氧氧化（通过线粒体内膜中的呼吸装置，第 14 章）并伴有水的生成。

13.29 由于酰基不能被运输进线粒体基质，脂肪酸氧化将被抑制。这将限制长时间的肌肉活动。

13.30 是，血小板聚集依赖于血管内皮细胞释放的凝血噁烷。乙酰水杨酸抑制环加氧酶，因此，前列腺素和凝血噁烷的合成被抑制。

13.31 从食物中碳水化合物和蛋白质可合成甘油三酯。

13.32 为胆固醇的合成，胞质的 3-羟基-3 甲基戊二酰 CoA 合成酶生成 3-羟基-3 甲基戊二酰-CoA，线粒体 HMG-CoA 合成酶生成 HMG-CoA，它可被转化为乙酰乙酸。

13.33 胆固醇酯源自酰基 CoA 的活化：胆固醇酰基转移酶催化由酰基 CoA 形成酯；胆固醇酯也源自卵磷脂的活化；胆固醇酰基转移酶催化由磷脂酰胆碱形成酯。

13.34 脂库脂肪被利用，肝脏中脂肪酸 β-氧化增加。这可为酮体的合成提供乙酰 CoA。

13.35 长链脂肪酸在极性介质中较难溶解，但它们可形成盐，某些可作为去污剂来使用，并在脂蛋白中可与疏水的脂类聚合。

13.36 合成前列腺素，凝血噁烷和白细胞三烯。

第 14 章

14.11 (a) 15；(b) 3；(c) 36；(d) 16。

14.12 P/O 比例将下降。

14.13 约为 14。

14.14 复习题 14.8，并思考 NADH 和 $FADH_2$ 的代谢来源。解偶联剂，如：2,4-二硝基苯酚，可使线粒体内膜对在电子传递过程中形成的质子通透。这些质子释放的能量返回线粒体基质导致体温增加；这可通过出汗得以减轻。因为在这种情况下，ATP 的合成不再完全与电子传递偶联，所以，NADH 和 $FADH_2$ 氧化必须增加以保持对细胞的 ATP 供应。由于这些化合物是在碳水化合物，脂类和蛋白质的分解代谢过程中形成的，所以存在一个这些身体成分的反转增加，使得体重丢失。

14.15 基于它们的可见吸收光谱。许多教材给出这些光谱的例子。

14.16 应用交换定律，并参考例 14.5 中的数据。在复合物 I、II 和 III（铁原子在 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的状态）中铁硫蛋白的比例可以通过线粒体制备物的电子自旋共振信号来估价。在鱼藤酮存在的情况下线粒体氧化 NADH，应用交换定律看到：复合物 I 中的铁硫蛋白中的铁原子将更多地被还原，而复合物 III 中的那些将被氧化，并比较在鱼藤酮不存在时的情况。用 KCN 处理线粒体，以上两组铁硫蛋白将更多地被还原。用抗霉素处理线粒体，复合物 I 铁硫蛋白将更多地被还原，而在复合物 II 中也许如此，也许不如此，这基于抗霉素在该复合物中作用的位点。

14.17 114kJ/mol。

14.18 亚硝酸可将某些亚铁血红蛋白转化为高铁血红蛋白。后者可与氰化物结合，通过与其高铁血红素环结合，阻止它灭活细胞色素 a 和 a_3。

14.19 (a) 氧化磷酸化比底物水平磷酸化有效。
(b) 乳酸形成所需的 NADH 在氧化磷酸化过程中将被氧化为 NAD^+。

第 15 章

15.18 基于此种膳食的人将处于负氮平衡，不能维持正常的代谢。

15.19 是，因为奶酪含有动物蛋白质。

15.20 (a) 胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶；(b) 弹性蛋白酶，胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶；(c) 胃蛋白酶，胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶。

15.21 谷氨酰胺酶，天冬氨酸氨基转移酶，TCA 循环酶，柠檬酸裂解酶，苹果酸脱氢酶和 $NADP^+$ 依赖的苹果酸酶。

15.22 肝脏中游离精氨酸的浓度，由于它释放入血，对于维持儿童的生长是不够的，所以食物来源的精氨酸是必需的。

第 16 章

16.34 (a) 在方向不同的复制中，在起点形成的单个的复制叉沿 DNA 以惟一的方向移动。
(b) 滚环机制是不同方向复制的例子。

16.35 在胚胎细胞中，复制起始的位点在 DNA 上的间隔比最终分化的细胞更加靠近，因此，在整个范围内每个复制叉移动并复制互补 DNA 的距离非常短，整个过程的速度较快。

16.36 在后随链上 5′→3′外切核酸酶和聚合酶的活性分别被用来去除 RNA 引物以及用 DNA 将它们置换。3′→5′外切核酸酶活性被用于这个过程的校正。

16.37 在复制的起点。

16.38 它可以两种方式之一协助解旋；通过负超螺旋的引入，或在复制叉的前面去除正超螺旋。

16.39 不。

16.40 必须存在有 3′端的羟基和 5′端的磷酸，在被连在一起的链的每个末端有一个。

16.41 这与该酶的 3′→5′外切核酸酶有关。它可去除由聚合酶偶尔错配的核苷酸。

16.42 复制起点
↓ DNA 回旋酶 + SSB 蛋白质
在起点稳定的解旋的 DNA
↓ 引发体 + 引发酶 + rNTP + DNA 聚合酶 III + dNTP
先导链从引物伸展，远离另一模板的起点
↓ 引发体移动，远离另一模板的起点

后随链的引发和合成。复制泡形成。

16.43 *dna* 突变是：改变一个直接与复制过程有关的基因产物。

16.44 是，复制的程度依赖于 dTTP 的利用度。

16.45 它将阻止复制在起点的起始。

16.46 不。

16.47 DNA 聚合酶 I（与其相关的 5′→3′外切核酸酶活性）和 DNA 连接酶。

16.48 不。

16.49 它必须有一个在宿主细胞中有功能的复制起点。

16.50 引物。这些限定与被扩增序列的末端。

第 17 章

17.40 His-Ile-Thr-His-Glu-Arg-Glu。
[使用氨基酸的单字母符号（表 3.1），该序列读为：HI THERE!]

17.41 Met-Phe-Phe-Val-Phe。

17.42 较低的链，

17.43 核糖体 RNA（rRNA）。

17.44 不。RNA 聚合酶可重新起始链。

17.45 RNA 合成。

17.46 （b）。

17.47 （a）。

17.48 靠近 3′端。

17.49 是。（大肠杆菌 *lac* 阻抑物基因将形成单顺反子 mRNA）。

17.50 真核生物。

17.51 磷酸化将减少净的正电荷。

17.52 不。内含子和外显子均被转录，但只有外显子被翻译。

17.53 RNA。

17.54 拼接之前。

17.55 是。mRNA 的第一个外显子（最靠近 5′端）必须含有起始密码子。

17.56 不。组蛋白存在于真核生物中，利福霉素只在细菌中阻断转录。

17.57 密码子存在于 mRNA 中，而反密码子存在于 tRNA 中。

17.58 tRNA 分子不仅识别密码子，也识别核糖体的特异区域，延伸因子和适当的氨基酰－tRNA 合成酶，这些均涉及通过非共价键的协同相互作用。

17.59 单个 RNA 链可通过自身反向折叠及链内碱基互补形成几个双螺旋片段。

17.60 含有二者。

17.61 有更多种类的 tRNA。

17.62 小核糖体亚单位。

17.63 两步：每个负载的 tRNA 的结合，以及每个肽形成后的移位。

17.64 移位的末端。

17.65 RNA 盖帽发生在拼接之前，并且一定发生在核内。

17.66 前胰岛素原。

17.67 不。

17.68 与启动子位点结合。

17.69 阻抑物分子可与启动子结合，并阻断转录；辅阻抑物可与一个蛋白质结合使其成为阻抑物，然后该阻抑物可与启动子结合。

14.16 应用交换定律，并参考例 14.5 中的数据。在复合物 I、II 和 III（铁原子在 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的状态）中铁硫蛋白的比例可以通过线粒体制备物的电子自旋共振信号来估价。在鱼藤酮存在的情况下线粒体氧化 NADH，应用交换定律看到：复合物 I 中的铁硫蛋白中的铁原子将更多地被还原，而复合物 III 中的那些将被氧化，并比较在鱼藤酮不存在时的情况。用 KCN 处理线粒体，以上两组铁硫蛋白将更多地被还原。用抗霉素处理线粒体，复合物 I 铁硫蛋白将更多地被还原，而在复合物 II 中也许如此，也许不如此，这基于抗霉素在该复合物中作用的位点。

14.17 114kJ/mol。

14.18 亚硝酸可将某些亚铁血红蛋白转化为高铁血红蛋白。后者可与氰化物结合，通过与其高铁血红素环结合，阻止它灭活细胞色素 a 和 a_3。

14.19 (a) 氧化磷酸化比底物水平磷酸化有效。
(b) 乳酸形成所需的 NADH 在氧化磷酸化过程中将被氧化为 NAD^+。

第 15 章

15.18 基于此种膳食的人将处于负氮平衡，不能维持正常的代谢。

15.19 是，因为奶酪含有动物蛋白质。

15.20 (a) 胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶；(b) 弹性蛋白酶，胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶；(c) 胃蛋白酶，胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶。

15.21 谷氨酰胺酶，天冬氨酸氨基转移酶，TCA 循环酶，柠檬酸裂解酶，苹果酸脱氢酶和 $NADP^+$ 依赖的苹果酸酶。

15.22 肝脏中游离精氨酸的浓度，由于它释放入血，对于维持儿童的生长是不够的，所以食物来源的精氨酸是必需的。

第 16 章

16.34 (a) 在方向不同的复制中，在起点形成的单个的复制叉沿 DNA 以惟一的方向移动。
(b) 滚环机制是不同方向复制的例子。

16.35 在胚胎细胞中，复制起始的位点在 DNA 上的间隔比最终分化的细胞更加靠近，因此，在整个范围内每个复制叉移动并复制互补 DNA 的距离非常短，整个过程的速度较快。

16.36 在后随链上 5′→3′外切核酸酶和聚合酶的活性分别被用来去除 RNA 引物以及用 DNA 将它们置换。3′→5′外切核酸酶活性被用于这个过程的校正。

16.37 在复制的起点。

16.38 它可以两种方式之一协助解旋；通过负超螺旋的引入，或在复制叉的前面去除正超螺旋。

16.39 不。

16.40 必须存在有 3′端的羟基和 5′端的磷酸，在被连在一起的链的每个末端有一个。

16.41 这与该酶的 3′→5′外切核酸酶有关。它可去除由聚合酶偶尔错配的核苷酸。

16.42 复制起点
↓ DNA 回旋酶 + SSB 蛋白质
在起点稳定的解旋的 DNA
↓ 引发体 + 引发酶 + rNTP + DNA 聚合酶 III + dNTP
先导链从引物伸展，远离另一模板的起点
↓ 引发体移动，远离另一模板的起点